

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва препарату для захисту рослин
стрептофунгін. Дільниця біосинтезу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Тараман Юлія Вікторівна _____

Керівник:

Зав. каф. промислової біотехнології, д.т.н, доц.

Тодосійчук Тетяна Сергіївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н.

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Ст.викладач каф.екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Жукова Вероніка Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент (-ка) _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6214. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	80	
3	A1	ДП 6214. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6214. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6214. 03.000 ТК	Ферментер для виробничого культивування	1	

				ДП 6214 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Тараман Ю.В.				1	80
Керівн.	Тодосійчук Т.С				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ФБТ Гр. БТ-62	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Тараман Юлії Вікторівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва препарату для захисту рослин стрептофунгін. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д.т.н., доц. затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Streptomyces albus* UN 44; ферментер для промислового культивування - об'єм 3 м³; параметри культивування: поживне середовище на основі соєвого борошна та картопляного крохмалю, $t = 28 \pm 1$ °C, аерація, $\tau = 72$ год.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва препарату для захисту рослин від фітопатогенів; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс

виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 2 арк. А1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	09.03.20-25.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	25.03.20-15.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	15.04.20-30.04.20	
4.	Технологічна частина	30.04.20-15.05.20	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.20-30.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	15.05.20-30.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	30.05.20-05.06.20	

Студент

Юлія ТАРАМАН

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва препарату для
захисту рослин стрептофунгін. Дільниця біосинтезу»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

дипломного проекту студентки 4 курсу, групи БТ-62

спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія

Тараман Юлії Вікторівни

на тему «Технологія виробництва препарату для захисту рослин

Стрептофунгін. Дільниця біосинтезу»

Дипломний проект містить 80 с., 9 рис., 5 табл., 49 посилань. Робота присвячена розробці технології виробництва препарату для захисту рослин Стрептофунгін та дільниці біосинтезу продукту.

Запропоновано схему отримання штаму продуценту шляхом двоступінчастої послідовної обробки мутагенами: нітратною кислотою і ультрафіолетовим випромінюванням. В якості продуцента використовували штам актиноміцетів *Streptomyces albus* UN44. Наведено поживне середовище для вирощування посівного матеріалу та для виробничого культивування на основі гідролізованого крохмалю та соєвого борошна.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва препарату для захисту рослин. Відповідно до фізико-хімічних характеристик продукту розраховано та вибрано найбільш ефективне та перспективне обладнання для біосинтезу препарату для захисту рослин.

Розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва

ЗАСІБ ЗАХИСТУ РОСЛИН, ФІТОПАТОГЕНИ, STREPTOMYCES
ALBUS UN 44, ФЕРМЕНТЕР, БІОСИНТЕЗ.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ		
Розробив	Тараман Ю.В.						
Консульт.							
Керівник	Тодосічук Т.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	5	80
					НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		

ABSTRACT

degree project of a 4th year student, group BT-62
specialty 162 - Biotechnology and bioengineering

Taraman Yulia Victorovna

on the topic « Technology of production of a preparation for protection of plants
Streptofungin. Biosynthesis section»

The graduation project contains 80 pages, 9 pictures, 5 tables, 49 references.

The work is dedicated to the development of production technology of a drug for plant protection Streptofungin and product biosynthesis.

A scheme for obtaining a producer strain by two-step sequential treatment with mutagens: nitric acid and ultraviolet radiation is proposed. The producer of actinomycete *Streptomyces albus* UN44 was used as a producer. The nutrient medium for growing seed and for industrial cultivation on the basis of hydrolyzed starch and soy flour is given.

The technological and hardware schemes of production of the preparation for plant protection are substantiated and presented in the work. According to the physico-chemical characteristics of the product, the most effective and promising equipment for biosynthesis of the plant protection product was calculated and selected. Technological and hardware schemes of production are developed.

PLANT PROTECTION PRODUCT, PHYTOPATHOGENICS,
STREPTOMYCES ALBUS UN 44, FERMENTER, BIOSYNTHESIS.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ		
					РЕФЕРАТ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Тараман Ю.В.			Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.					Д	6	80
					НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		
Керівник		Тодосіючук Т.С.					
Затвер.							

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1. Основні промислові продуценти.....	11
1.2. Систематичне положення.....	13
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.4. Культуральні ознаки.....	15
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	17
1.6. Поширення в природі.....	19
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	22
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	22
2.2. Схема хімічних перетворень.....	23
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	25
2.4. Методи виділення і очистки цільового продукту.....	26
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	27
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	29
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	29
3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи.....	29
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	32
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму.....	33
3.2.1. Використання природного та штучного добору отримання промислових продуцентів.....	33
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....	34

					ДП 6219. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тараман Ю.В.			Зміст	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	7	80
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

3.3	Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	36
3.4	Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента.....	37
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....		39
4.1.	Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	39
4.2.	Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	40
4.3.	Опис технологічного процесу.....	43
4.4.	Матеріальний баланс.....	51
4.5.	Контроль виробництва.....	52
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....		55
5.1.	Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарат	55
5.2.	Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	61
5.3.	Вибір загальнозаводського обладнання.....	70
5.4.	Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	71
ВИСНОВКИ.....		74
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....		75

ВСТУП

Аналіз існуючих систем захисту сільськогосподарських культур від хвороб і шкідників свідчить, що успіхи у застосуванні пестицидів, які спостерігалися у середині XX століття, у нинішніх умовах суттєво зменшилися через негативні їх наслідки на навколишнє середовище. Це спонукало науковців на пошуки альтернативних екологічно безпечних заходів, серед яких все більше уваги приділяється засобам біологічного контролю патогенів і шкідників сільськогосподарських рослин. [1]

Актиноміцети – один із головних об’єктів мікробних біотехнологій. Як продуценти широкого спектра біологічно активних сполук (антибіотиків, ферментів, вітамінів, фітогормонів, сидерофорів та ін.) вони мають велике значення сільського господарства. [12]

Одною з мікробних культур, що відома як продуцент комплексу бактеріолізинів та антибіотиків, є актиноміцет *Streptomyces albus*. Здатність культури виявляти антагоністичну активність, стали основою для розгляду можливостей отримання альтернативних готових форм антимікробних продуктів різного призначення. Для цього був обраний штам *S. albus* UN44, який є продуцентом біомаси клітин, які при внесенні в ґрунт синтезують комплекс антибіотичних речовин аліфатичної будови, що визначає активність препарату на основі даного продуценту щодо захисту рослин. Характеристика стрептофунгіну визначається антагоністичною активністю штаму *S. albus* UN44.

Метою даної роботи є розробка технології виробництва препарату для захисту рослин стрептофунгін.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

- встановити особливості обраного продуценту для

					ДП 6214. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Тараман Ю.В.				Д	9	80
Консульт.								
Керівник		Тодосічук Т.С.						
Затвер.						НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		

виробництва препарату для захисту рослин;

- провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів;
- обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті;
- визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту для розробки способу його виділення;
- розробити технологічну і апаратурну схему;
- обґрунтувати вибір конструкції ферментеру та здійснити його технологічний та конструктивний розрахунки.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Аналіз існуючих систем захисту сільськогосподарських культур від хвороб і шкідників свідчить, що успіхи у застосуванні пестицидів, які спостерігалися у середині ХХ століття, у нинішніх умовах суттєво зменшилися через негативні їх наслідки на навколишнє середовище. Це спонукало науковців на пошуки альтернативних екологічно безпечних заходів, серед яких все більше уваги приділяється засобам біологічного контролю патогенів і шкідників сільськогосподарських рослин.

Головним знаряддям біоконтролю є мікроорганізми, серед яких чільне місце посідають актиноміцети, в основному представники роду *Streptomyces*. Вони продукують широкий спектр антибіотиків, а також ферменти та інші біологічно активні сполуки.

Серед біологічних антипаразитарних засобів особливий інтерес становлять препарати на основі авермектинового антибіотичного комплексу (продуцент *Streptomyces avermitilis*), які у наш час визнані найбільш ефективними проти паразитичних нематод, кліщів і шкідливих комах. На основі авермектину створено ряд препаратів, які використовують як біопестициди для регуляції чисельності екзо- і ендопаразитів рослин, у тому числі і нематод. Це – Фітоверм, Формации (Аверсект-2), Аверсектин С, Універм, Еквісект (Росія); Івермектин, Івомек, Еквалан, Дорамектин, Абамаектин, Зімектрин (США) та інші. На основі українського штаму *S. avermitilis* ІМВ Ас-5015 – продуценту авермектину розроблено новий препарат Аверком, який, на відміну від існуючих комерційних препаратів, характеризується не тільки антипаразитарною, але й фітостимулювальною дією [2,3].

					ДП 6214. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Тараман Ю.В.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	11	80
						НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		
Керівник	Тодосієчук Т.С.							
Затвер.								

В даний час відомі вітчизняні та зарубіжні засоби біологічного захисту рослин - фітоспорін, бактофіт, фітолавін і ін., але в силу того, що вони не універсальні і часто не володіють необхідним спектром дії, їх асортимент оцінюється як недостатній.

Відомо, що для підвищення стійкості рослин до патогенів використовують еліситори. До них відносять метаболіти паразитів або їхніх рослингосподарів (полісахариди, білки, поліпептиди, глікопротеїни, ліпідвмісні сполуки та ін.); вони виявляють свою активність у дуже малих концентраціях.

Як еліситори можуть виступати також органічні кислоти – арахідонова, ацетил-саліцилова, жасмонова, ізо-нікотинова, та хітозан з молекулярною масою 5 кДа. Наразі еліситори використовують для захисту від хвороб багатьох овочевих, зернових і технічних культур. На їхній основі створено широко відомі препарати Імуноцитофіт (діюча речовина – арахідонова кислота) і Агрохіт (діюча речовина – хітозан, 5 кДа) [4]. Як показали результати досліджень, ефективним виявилось поєднання Аверкому з еліситором хітозаном, що підсилює антинематодну дію препарату Аверком-нова.

Актиноміцети продовжують привертати до себе велику увагу дослідників насамперед як потенційне джерело продуцентів нових антибіотиків. Актиноміцет *Streptomyces albus* (первісно ідентифікований *S. recifensis var. lyticus*) відомий як продуцент комплексу антибіотиків.

Культура виявляє антагоністичну активність, тому її розглядають для отримання альтернативних готових форм антимікробних продуктів. Для цього був обраний штам *S. albus UN44*, який є продуцентом біомаси клітин, які при внесенні в ґрунт синтезують комплекс антибіотичних речовин аліфатичної будови, що визначає активність препарату на основі даного продуценту щодо захисту рослин. Характеристика стрептофунгіну визначається антагоністичною активністю штаму *S. albus UN44*. [5]

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

1.2. Систематичне положення

S. albus займає наступну таксономічну нішу:

Домен:	<i>Bacteria</i>
Тип:	<i>Actinobacteria</i>
Клас:	<i>Actinobacteria</i>
Ряд:	<i>Actinomycetales</i>
Родина:	<i>Streptomycetaceae</i>
Рід:	<i>Streptomyces</i>
Вид:	<i>Albus</i>
Штам:	UN44

За визначником Берджі *S. albus* відноситься до групи 25.

1.3. Морфологічно-цитологічні ознаки

S. albus відноситься до бактерій ряду *Actinomycetales*. Актиноміцети – переважно тонкі прямі чи зігнуті палички розміром 0,2-1,0 x 2-5 мкм. Кінці паличок часто булавоподібно потовщені. Для актиноміцетів характерна є і 54 ниткоподібна форма довжиною 10-50 нм. Ниткоподібні форми часто розгалужені, кінці їх – булавоподібні.

В гіфах актиноміцетів виявляються всі компоненти, такі як ядерна область, цитоплазма з різним ступенем базofilії, вакуолі, волютинові гранули, клітинна стінка. [6] Актиноміцети мають щільну бактеріальну клітинну стінку, яка розташована зовні від цитоплазматичної мембрани і обумовлює їх позитивне забарвлення по Граму. Вона складається в основному з гліколіпиду (пептидоглікану, муреїну), тейхоевих кислот та полісахаридів.

Представники родини *Streptomycetaceae* утворюють розгалужений міцелій, зазвичай 0,7-0,9 мкм в діаметрі, зазвичай нефрагментований. Міцелій поділяється на первинний (субстратний) і вторинний (повітряний); останній може бути відсутній. У *S. albus* забарвлення повітряного міцелію

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

коливається від білого до світло-кавового, субстратний міцелій майже безбарвний.

Зростання відбувається на верхівках гіф і супроводжується розгалуженням, тим самим створюючи складну матрицю з щільної тканини гіф в фазі вегетативного росту. У розвинутій колонії, утворюється повітряний міцелій (спороносці), який розвиваються у вигляді ланцюжків безстатевих екзоспор (конідій). Спори нерухомі, утворюються у вигляді ланцюжків на спеціальних гіфах повітряного міцелію. Конідії служать для перенесення несприятливих умов зовнішнього середовища і розмноження. Вони утворюються відгалужуючись від стерильних гіф повітряного міцелію моноподіально або у вигляді пучків.

Міцелій у справжніх актиноміцетів зберігається постійно, розчленовування з віком на коки і палички не спостерігається. Характерною ознакою *S. albus* є овальні, гладкі спори, що утворюються шляхом фрагментації. Спороносці короткі трохи хвилясті, мало розгалужені. На поверхні колоній можуть утворюватися склероції [8].

Всі стрептоміцети - облігатні аероби. Вони не вимогливі до субстратів, не потребують факторів росту, переважно сапрофіти. Колонії повільно зростають і часто мають запах ґрунту через виробництво летючого метаболіту, геосміну. Стрептоміцети здатні продукувати широкий спектр пігментів, що відповідають за колір вегетативного та повітряного міцелію.

Плеоморфізм наявний в усіх видів, розмножуються шляхом поділу клітин, фрагментації міцелію чи утворення спор. Життєвий цикл стрептоміцетів починається, коли спора осідає в поживному збагаченому середовищі. Це стимулює спору до проростання та формування зародкової трубки. Зародкові трубки ростуть на кінчику і клітина не піддається бінарному поділу. Розширення та розгалуження зародкової трубки призводить до утворення мережі волокон, які ростуть в середину і по всій поверхні середовища.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

Первинний міцелій розвивається після початкової фази ядерного поділу і формує бічні розгалуження, а потім відбувається утворення поодиноких горбиків гіф. Ці горбики ростуть з утворенням великих округлих клітин, кожна з яких містить багато ядер. Вторинний міцелій розвивається, частина якого закінчуватиметься у вигляді ланцюжка спор.

У актиноміцетів роду *Streptomyces* наявні активні ферментні системи, що дозволяють руйнувати і використовувати найрізноманітніші сполуки. Актиноміцети продукують гідролітичні ферменти, як протеази, амілази, кератінази, хітинази і ін., які забезпечують розщеплення стійких фенольних сполук, що входять до складу гумусу. Деякі види актиноміцетів здійснюють трансформацію поліциклічних сполук - стероїдів - в біологічно активні сполуки - стероїдні гормони (кортизон). На різних середовищах мікроорганізми споживають різні сполуки. Ці та інші особливості необхідно враховувати при підборі субстрату для культивування [6].

1.4. Культуральні ознаки

Представники роду *Streptomyces* добре ростуть на штучних поживних середовищах, як на щільних агаризованих, так і на рідких. Розвиток мікроорганізмів залежить від складу поживного середовища, температури, світла, кількості посівного матеріалу та інших факторів.

Рід *Streptomyces* має вегетативні гіфи діаметром 0,5-2,0 мкм, які мають сильно розгалужений міцелій, що яасом розпадається на фрагменти (*S. abus*, *S. antibioticus*, *S. diastaticus*, *S. albidoflavus*, *S. griseoviridis*).

Актиноміцети здатні утворювати пігмент і можуть бути різні за: рожевий, червоний, бурий, чорний тощо. Безбарвні при зростанні на середовищах не здатні утворювати якихось барвників. Їх повітряний міцелій може бути білим, світло-сірим, кремовим, нижня сторона колонії безбарвна. Колонії актиноміцетів, які утворюють пігмент, при зростанні на середовищах набувають різне забарвлення: синє, фіолетове, червоне, рожеве, жовте,

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

помаранчеве, зелене, чорне, коричневе. Часто колонії забарвлені в змішані тони.

Пігменти утворюються при вільному доступі кисню. В анаеробних умовах багато культур стають безбарвними, пігмент зникає. Пігменти мають різноманітні хімічні і фізичні властивості. Одні добре розчиняються у воді і етиловому спирті; інші не розчиняються у воді, але розчиняються в спирті, ефірі та інших органічних розчинниках; треті не розчиняються ні у воді, ні в органічних розчинниках. Нерозчинні пігменти пов'язані з плазмою, не виділяються з клітини і не проникають в поживне середовище. Пігменти, розчинні у воді, легко виділяються назовні і проникають в середовище, фарбуючи його у відповідний колір.

Близько 50% культур актиноміцетів здатні утворювати бурі речовини. Встановлено, що бурий колір обумовлений наявністю пігменту меланоїдного типу, а також здатністю актиноміцетів продукувати ферменти тирозиназу і лаказу [6]. Культуральні ознаки актиноміцетів зазвичай описують на щільних поживних середовищах. Відзначають особливості колоній і росту актиноміцетів, колір повітряного міцелію, колір субстратного міцелію, забарвлення середовища. [9]

Актиноміцети цього роду утворюють добре розвинутий міцелій. Колонії зазвичай не великі, 1-10 мм в діаметрі, щільні, шкірясті, що врастаються в субстрат. Поверхні колоній, як правило, вкрита борошністим, оксамитовим або пухнастим повітряним міцелієм, який часто товстіший субстратного та володіє гідрофільними властивостями.

Штам *S. albus* UN44 за класифікацією Красильникова належить до серії *Albus*. Актиноміцети цієї серії утворюють на мінеральних середовищах білий або кремовий повітряний міцелій, субстратний міцелій прозорий на вівсяному агарі. На гліцерин-нітратному агарі повітряний міцелій білий до кремового, субстратний міцелій прозорий, деколи блідно-бурий, блідно-жовтий. Меланоїдні пігменти не утворює [10].

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Для *S. albus* UN44 характерний гетеротрофний тип живлення. Джерела азоту мають значний вплив на утворення речовин-антибіотиків мікроорганізмами. Організми можуть добре розвиватися на середовищах з одними джерелами азоту, але в даних умовах не синтезують антибіотик. Зазвичай в середовищах для культивування мікроорганізмів джерелом азоту служать солі азотної (HNO_3), рідше азотистої (HNO_2) кислоти, амонійні солі органічних або неорганічних кислот ($-\text{NH}_4$) або амінокислоти ($-\text{NH}_2$), білки і продукти їх гідролізу (пептони, гідролізат). У цих джерелах азот знаходиться або в окисненій ($-\text{NO}_3$, $-\text{NO}_2$), або у відновленій формі (NH_4^+ , $-\text{NH}_2$) [11].

Штам *S. albus* UN44 використовує для росту такі цукри: глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, арабінозу, мальтозу, маніт. Слабко застосовує лактозу, дульцит, інозит, сахарозу, рамнозу. Не здатен зброджувати сорбіт. Для *S. albus* UN44 характерний гетеротрофний тип живлення. Більшість актиноміцетів є нейтрофілами. Оптимальні значення pH середовища для обраного штаму $6,5 \pm 1$.

Актиноміцети є більш стійкими, в порівнянні з іншими бактеріями, до дії багатьох фунгіцидів та інсектицидів. Деякі роди стійкі до антибактеріальних антибіотиків і цю їх властивість використовують для селективного виділення актиноміцетів з ґрунтів.

Штам *S. albus* UN44 являється аеробом, хемоорганотрофом, метаболізм окисного типу. Штам розріджує желатин, створює молоко, відновлює нітрати в нітрити, не виявляє тирозиназної активності. Вирощування штаму здійснюється при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ та перемішуванні при швидкості до 220 об/хв. протягом 48-72 годин. *S. albus* UN 44 добре росте на середовищах агар Чапека, вівсяний агар, мінеральний агар Гаузе, органічний агар Гаузе, глюкозо-аспарагіновий агар, сусло-агар. Добре розвинутий повітряний міцелій утворюється на зазначених середовищах на п'яту-шосту добу. [6]. Характер росту штаму на різних середовищах та морфологія органів плодоношення показані у таблиці 1.1.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

Для культивування обрано поживне середовище зі складом: глюкоза – 6,0; соєве борошно дезодороване – 8,0; NaCl – 14,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 2,0; $CaCl_2$ – 4,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 5,8; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,04; пропінол Б – 400. рН 7,8-8,2 [5]. Оскільки глюкоза є відносно високовартісною сировиною, було запропоновано замінити глюкозу на крохмаль картопляний гідролізований в поживному середовищі для виробничого біосинтезу.

Отже, обрано поживне середовище наступного складу: соєве борошно- 8,0; крохмаль картопляний гідролізований - 10,0; NaCl - 14,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 2,0; $MgCl_2$ -2,2; $CaCl_2$ -2,0; $MnCl_2 \times 4H_2O$ - 0,04; пропінол Б-400; рН 7,8-8,2. [5]

Таблиця 1.1. Морфологія органів плодоношення штаму *S. albus* UN 44 при вирощуванні на різних середовищах [5]

Сер-ще культивування	Характер росту	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Розчинний пігмент	Форма спороносців	Форма спор та спосіб утворення
Агар Чапека	задовільний	блідो-білий	безбарвний	немає	прямі чи трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

Вівсяний агар	дуже добрий	білий	безбарвний	немає	прямі чи трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Мінеральний агар Гаузе	добрий	білий	безбарвний	немає	прямі чи трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

Органічний агар Гаузе	дуже добрий	білий до кремового	безбарвний	немає	прямі чи трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Глюкозо-аспарагінний агар	задовільний	Світло сірий з жовтуватим	безбарвний	немає	прямі чи трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Сусло-агар	добрий	світло – кавовий	безбарвний	немає	прямі чи трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

1.6. Поширення в природі

В останні роки мікробіологічний контроль фітопатогенів розглядається як альтернатива хімічним речовинам, які тривалий час застосовуються в сільському господарстві. Мікроорганізми різних систематичних груп - гриби, бактерії, актиноміцети, є невичерпним джерелом біологічно активних речовин, які можуть бути використані в багатьох сферах, в тому числі і для вирішення проблеми захисту рослин від фітопатогенів.

В даний час відомі вітчизняні та зарубіжні засоби біологічного захисту рослин - фітоспорін, бактофіт, фітолавін і ін., але в силу того, що вони не універсальні і часто не володіють необхідним спектром дії, їх асортимент оцінюється як недостатній. Важливим є той факт, що при зміні умов середовища - різкі коливання вологості, температури, радіації, вмісту поживних речовин і багатьох інших, типи відносин між мікроорганізмами можуть істотно змінюватися. Серед метаболітів з антагоністичної активністю, утворених мікроорганізмами, найбільш ефективними є

антибіотики, а їх найбільш перспективні продуценти - актиноміцети роду *Streptomyces*.

Актиноміцети широко розповсюджені у природі: в ґрунтах різних типів, солених і прісних водоймах, травній системі безхребетних тощо . Актиноміцети також наявні в повітрі. Там вони знаходяться переважно у вигляді спор, враховуючи малі розміри (близько 1 мкм в діаметрі) і порівняну стійкість спор багатьох актиноміцетів до висушування, можна вважати, що спори з повітряними потоками переносяться на значні відстані. [6]

Багато видів цих бактерій є симбіонтами рослин, які розвиваються в їхній ризосфері або судинній системі (так звані ендofітні актиноміцети). Коренева система рослин формує особливе середовище, збагачене поживними речовинами, легкодоступними для мікроорганізмів. Тісні симбіотичні зв'язки надзвичайно вигідні й актиноміцетам, і рослинам. Синтезуючи комплекс біологічно активних сполук, вони сприяють росту і захисту рослин від фітопатогенної мікрофлори . У свою чергу, рослини постачають їм необхідні джерела живлення. [12] Цілеспрямовану роль актиноміцети грають в місцях первинного ґрунтоутворення, перебуваючи в цих умовах в асоціації з водоростю. Ці асоціації в лабораторних умовах формували лишайникоподібний талом (актинолишайник).

Ґрунти є тим природним субстратом, звідки стрептоміцети виділяють найбільше. Але більша частина біомаси стрептоміцетів представлена спорами, які й дають колонії при обліку популяцій в ґрунті методом посіву, тільки 1-4% біомаси займає міцелій. Він виявляється в мікроронах з підвищеним вмістом органічної речовини.

Стрептоміцети домінують на пізніх стадіях мікробної сукцесії, коли створюються умови для використання важкодоступних субстратів. Активация стрептоміцетної мікрофлори відбувається при внесенні в ґрунт крохмалю, хітину, нафтопродуктів і т.д. Значну роль у родючості ґрунту відіграють ґрунтові актиноміцети. Їм притаманна висока фізіологічна

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

активність. Вони можуть розвиватись на різноманітних субстратах, а також продукувати антибіотичні та фітотоксичні сполуки.

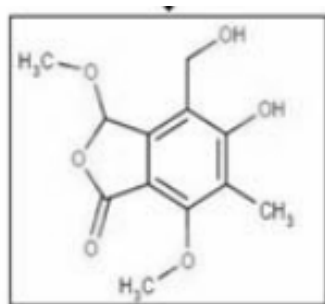
					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

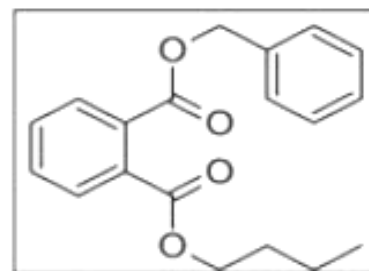
Кінцевим продуктом являється препарат для захисту рослин від фітопатогенів – Стрептофунгін, діючою речовиною якого в складі готового продукту є антибіотичні речовини. Був обраний штам *S. albus* UN44, який є продуцентом комплексу антибіотичних речовин аліфатичної будови, які починають вироблятися при внесенні в ґрунт біомаси клітин продуцентів.

Основні антибіотичні сполуки ідентифіковані як 3-о-метилциклополова кислота та біс(2-етилгексил)фталат (рис. 2.1)[15], які відносяться до групи похідних фталевого альдегіду, якому притаманна антимікробна дія.



3-O-Methylcyclopolic acid

а)



Bis (2-ethylhexyl) phthalate

б)

Рис.2.1. Основні антибіотичні сполуки в складі препарату захисту рослин

Стрептофунгін: а) 3-о-метилциклополова кислота;

б) біс(2-етилгексил)фталат. [15]

Відомо, що 3-о-метилциклополова кислота та біс(2-етилгексил)фталат мають антифунгальні властивості завдяки наявності в їхній структурі о-діальдегідної групи, відновлення або окислення якої з перетворенням у фталіловий спирт, формілбензойну кислоту і диметилфталат повністю приводить до втрати антибіотичної дії.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тараман Ю.В.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	22	80
						НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		
Керівник		Тодосічук Т.С.						
Затвер.								

2.2. Схема хімічних перетворень

Для виробничого біосинтезу культурою *S. albus* UN44 було вибрано середовище наступного складу: соєве борошно - 8,0; крохмаль картопляний гідролізований - 10,0; NaCl - 14,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ -2,0; $MgCl_2$ -2,2; $CaCl_2$ -2,0; $MnCl_2 \times 4H_2O$ - 0,04; пропінол Б-400; рН 7,8-8,2 [13].

Білковий обмін характеризується катаболізмом і анаболізмом. В процесі катаболізму бактерії розкладають білки під дією протеаз з утворенням пептидів. Під дією пептидаз з пептидів утворюються амінокислоти.

При отриманні препарату Стрептофунгін утилізація продуцентом основного компоненту поживного середовища – глюкози, відбувається за метаболічним шляхом Ентнера-Дудорова одним з продуктів якого є піруват, який є важливою сполукою для подальшого біосинтезу, оскільки з нього, шляхом декарбоксилування, утворюється ацетат, який є джерелом атомів вуглецю у структурі аглікону (рис.2.2).

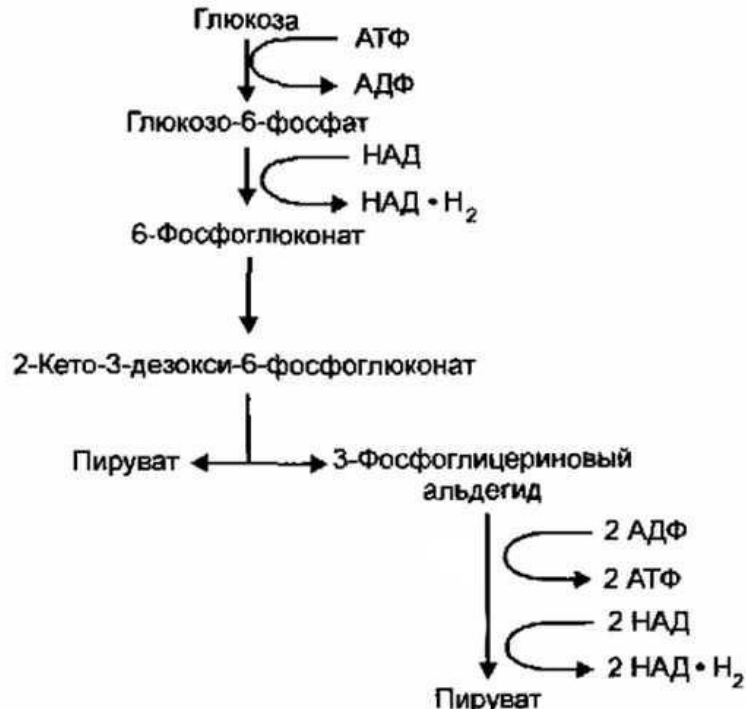


Рис.2.2. Схема утилізації глюкози продуцентом *S. albus* UN 44 за метаболічним шляхом Ентнера-Дудорова [23]

При біосинтезі антибіотиків не відбувається відновлення карбонільних груп після реакції конденсації або таке відновлення відбувається до утворення гідроксильної групи або подвійних зв'язків. При повному відновленні утворюються ароматичні структури.

Біс(2-етилгексил)фталат є ефіром ортофталевої кислоти та 2-етилгексилового спирту. 3-О-метилциклопальова кислота є похідним циклопальдової кислоти. Циклопальдова кислота, $C_{11}H_{10}O_6$, існує у двох таутомерних формах-альдегідній- та лакто-формах.



Рис.2.3. Таутомерні перетворення циклопальдової кислоти [14,16]

Неактивна циклопальдова кислота може трансформуватися в активну форму-циклопальдову кислоту окисненням (рис.2.3.)[14,16]. Оскільки основною функціональною групою цільових продуктів є ароматичні кільця, доцільно припустити, що їх синтез відбувається за шикіматним шляхом. [16]

Кінцевою сполукою шикіматного шляху є хоризмат, який виступає попередником трьох ароматичних амінокислот: фенілаланіну, тирозину і триптофану. На цьому етапі шлях розгалужується, і подальший синтез усіх метаболітів відбувається індивідуально. У зв'язку з цим регуляцію їх синтезу необхідно досліджувати як на рівні ключового ферменту (ДАГФ-синтази), так і на кожному з цих етапів, що забезпечують подальші перетворення хоризмату в різні ароматичні продукти [15].

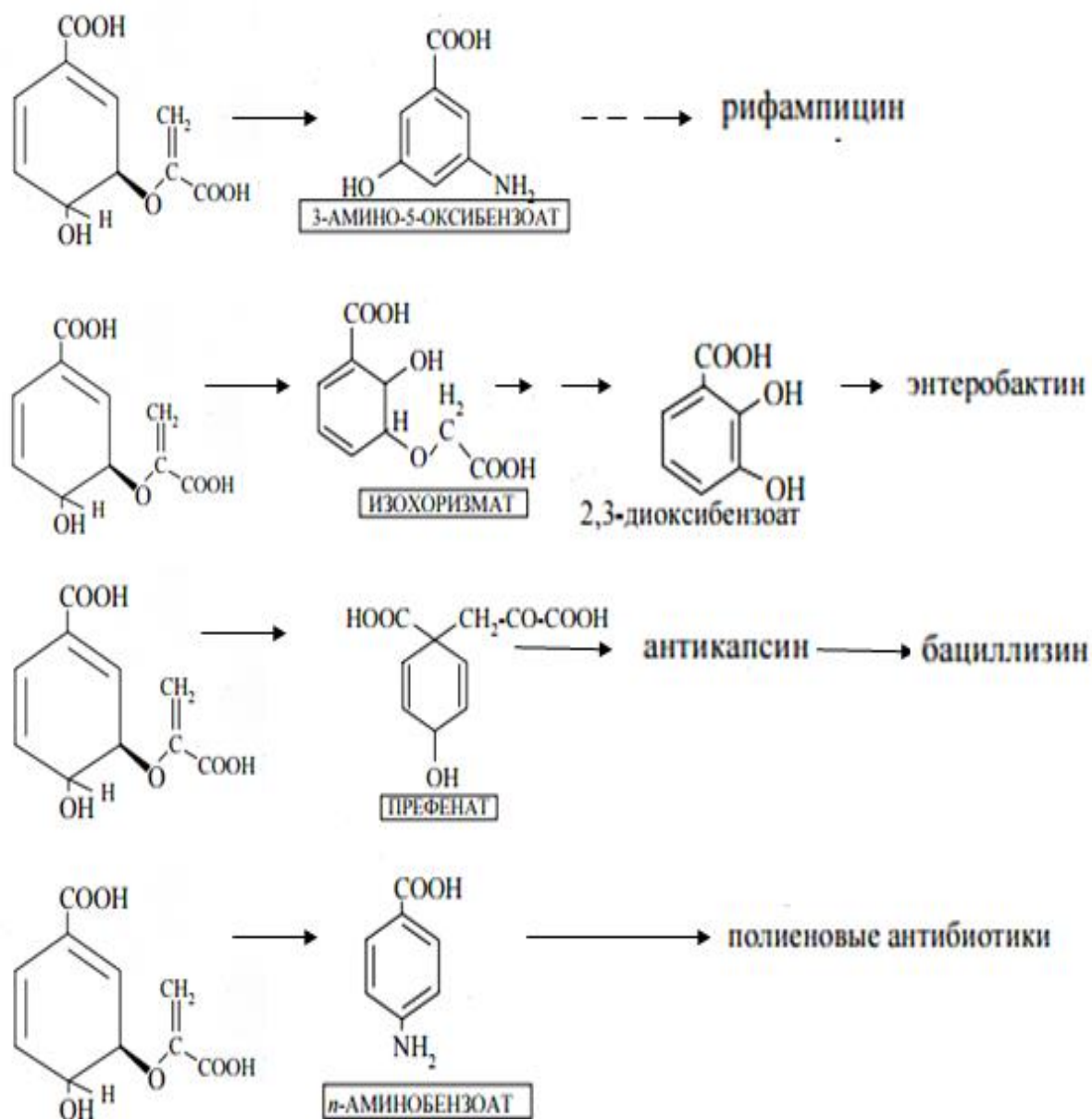


Рис. 2.4. Принципові схеми біосинтезу антибіотичних сполук ароматичної будови з шикімату [16]

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Кінцевий продукт є препаратом для захисту рослин від мікробних фітопатогенів. Препарат є нестерильним. Кількість мікроорганізмів не більше 10^5 КУО/г.

Отриманий препарат містить висушену біомасу клітин продуценту 60% та залишки поживного середовища 40 %. Залишки представленні

антибіотичними речовинами 5%, ферментами та ін. Перед тим, як випустити препарат обов'язково перевіряють кожну партію продукту на ідентичність, чистоту і проводять відповідне кількісне визначення, виконуючи цілий ряд хімічних, фізичних, і біологічних випробувань.

2.4. Методи виділення і очистки цільового продукту

Препарат захисту рослин від фітопатогенів Стрептофунгін може бути отриманий як на основі відділеної біомаси продуцента, так і на основі культуральної рідини. Висушена біомаса продуцента *Streptomyces albus* UN44 завдяки її високій антифунгальній активності може використовуватися як окремий біопрепарат. Важливим завданням є максимальне нарощування біомаси клітин продуцента, оскільки при внесенні препарату в ґрунт, *S. albus* UN44 починає секретувати антибіотичні речовини.

Нарощена біомаса не потребує очистки, але потребує виділення. Виділення біомаси доцільно проводити центрифугуванням. Найкраще виділення біомаси спостерігається при правильній швидкості подачі рідини. Швидкість обертання валу центрифуги має бути 10 000 об / хв. Після центрифугування необхідно зробити клітинну суспензію з вмістом клітин 25-30 % для того, щоб подати її на сушку для отримання цільового продукту – порошку Стрептофунгін.

Сушіння проходить в сушарці розпилюючого типу. Розпилювальне сушіння є дуже поширеним методом одержання продуктів мікробіологічного синтезу з нативних розчинів, так як воно є досить швидше і висушування відбувається протягом декількох секунд. Суспензія висушуваного матеріалу безперервно подається зверху на відцентровий механізм і розпилюється на частинки розміром 60—70 мкм.

Препарат для рослинництва Стрептофунгін може бути представлений у двох формах : рідина і сухий порошок. Було обрано суху форму препарату, оскільки вона містить декілька переваг. Порошок, на відміну, від рідини

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

краще зберігається та має більший термін придатності, що є не мало важливим.

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Кінцевим продуктом являється препарат для захисту рослин від фітопатогенів – Стрептофунгін, діючою речовиною якого в складі готового продукту є антибіотичні речовини.

Біомаса клітин продуцента після внесенні в ґрунт починає синтез антибіотичних сполук і тим самим набуває антифунгальних властивостей проти фітопатогенів. Близько 80 % всіх захворювань рослин викликані саме грибами-фітопатогенами. Фунгіциди - використовуються для боротьби з хворобами та фітопатогенними грибами, такими як *Bipolaris*, *Fusarium* та ін.-збудниками захворювань рослин.

Фунгіциди за механізмом дії поділяють на дві групи:

- впливають на патогенез в рослинах-господарях;
- впливають безпосередньо на життєво важливі біохімічні процеси в клітинах збудника.

В останньому випадку активність нерідко обумовлена виборчим, або специфічним, пригніченням відповідних ферментів, які відіграють роль біологічних каталізаторів в живих клітинах грибів. Стрептофунгін відноситься до фунгіцидів які впливають на патогенез в рослинах-господарях. Речовини, що впливають на патогенез в тканинах, проявляють ефект опосередковано через цю рослину. Вони, як правило, більш активні *in vivo*, ніж *in vitro*.

Діють на патоген в основному їх фунгітоксичні метаболіти – антигрибкові фітоалексини, або динамічні антибіотики у випадку Стрептофунгіну. Може утворюватися локальна лігніфікації - некрози в якості бар'єру з мертвої тканини в місцях впровадження патогена в клітини рослин. Наведені приклади є випадками придбаного штучного неінфекційного імунітету і активного імунітету типу захисної реакції, званої надчутливістю.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

Речовини, що впливають на патогенез, називають імунізатори, або системними псевдофунгіцидами. Вони здатні активно колонізувати коріння рослин, що дозволяє їм не тільки успішно захищати рослини від паразитів, але й стимулювати ріст і розвиток рослин.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Секвенування геномів мікроорганізмів вказує на те, що організми здатні синтезувати у 5–10 разів більше вторинних метаболітів, ніж це виявлено у ході традиційного скринінгу. Секвенування геномів мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків дало багато можливостей для продуцентів ще невідомих антибіотиків або для зміни відомих.

Streptomyces albus J1074 - одна із найзручніших форм для експресії кластерів генів актиноміцетного походження. [25] Для вдосконалення його можливостей щодо гетерологічної експресії біосинтетичних генних кластерів була отримана повна геномна послідовність *S. albus* J1074. Маючи розмір 6,841,649 п.о., що кодує 5,832 генів, його геном є найменшим в межах роду стрептоміцетів. Аналіз хромосомних генів показав, що *S. albus* має тенденцію до скорочення числа ортологічних груп генів. Геном виявив 22 додаткові ймовірні кластери генів вторинного метаболіту, що підсилюють потенціал штаму для синтезу природних продуктів.

На відміну від геномів інших стрептоміцетів, одна хромосома включає сім оперонів рРНК (16S-23S-5S) та 66 генів тРНК (41 вид). Швидкі темпи зростання та універсальність цього штаму пояснюється наявністю семи оперонів рРНК.

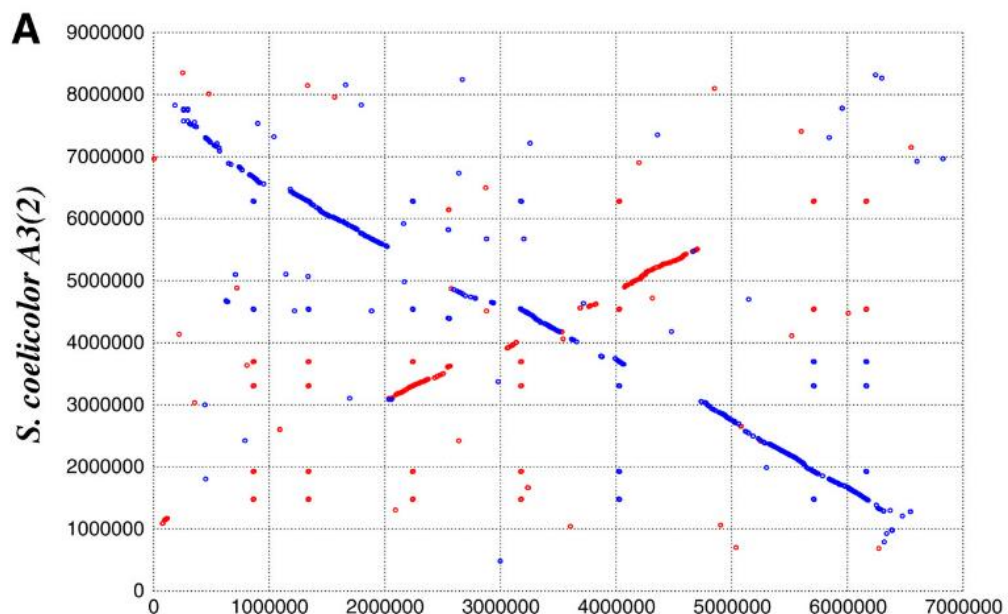
Загальні особливості однієї послідовності хромосоми представлені в таблиці 3.1. [26]

					ДП 6214. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розробив	Тараман Ю.В.						
Консульт.							
Керівник	Тодосіичук Т.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	29	80
					НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		

Таблиця 3.1. Загальні характеристики хромосоми *S. albus* J1074

Топологія	Лінійна
Загальний розмір	6 841 649 bp
Термінальні інвертовані повтори	2 × 30 000
Вміст G+C	73,3%
Кодуючих послідовностей	5 832
Середня довжина гену	1011 bp
Щільність кодування	88,8%
Рибосомальних РНК	7х(16S-23S-5S)
Транспортних РНК	66 (41 вид)

Хромосома *S. albus* J1074 містить 5832 передбачувані білки, що кодують послідовності (CDS). 1172 ORF (20%) були позначені як гени, що кодують гіпотетичні білки. Походження реплікації виявило ідеальну симетрію і розташоване саме посередині хромосоми, розташованої в 580 bp зліва від центру. Центральне «ядро», яке містить основні гени, містить майже всю хромосому приблизно від 0,3 Mb до 6,4 Mb. Зважаючи на це, геномна топологія *S. albus* є найменшою, якщо її порівнювати з іншими секвенсованими геномами (Рис. 3.1).



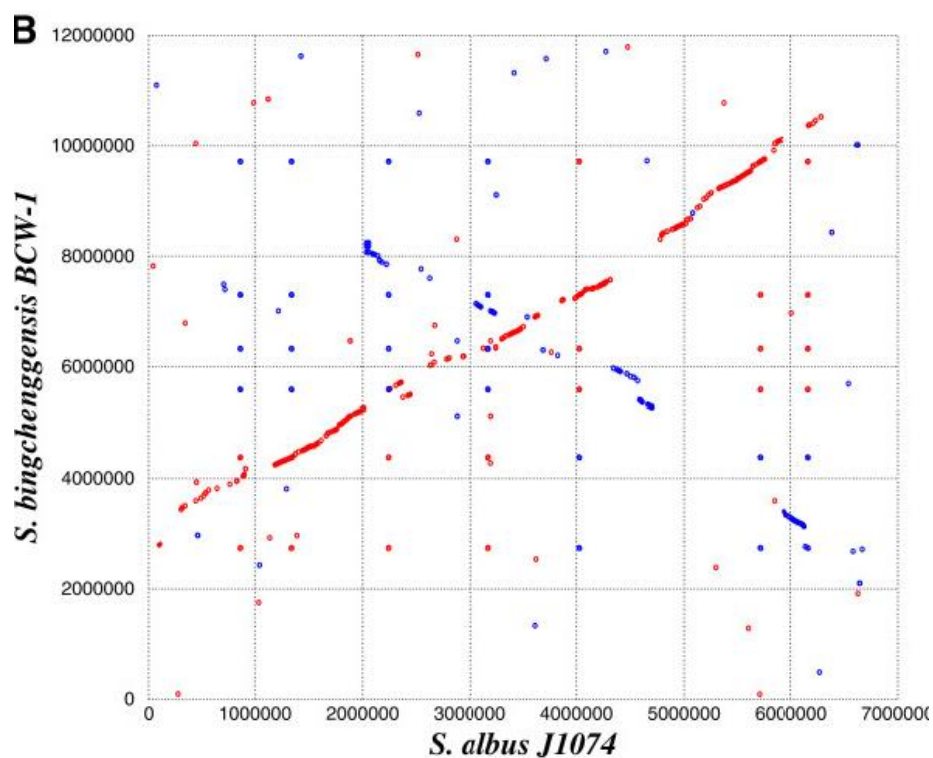


Рис. 3.1. Геномні порівняння послідовностей трьох штамів *Streptomyces*. (A) *S. albus* та *S. coelicolor*; (B) *S. albus* та *S. bingchenggensis*. Чорна смуга в нижній частині позначає область серцевини *S. albus*.

Передбачуванні гени транспозаз зустрічаються по всій хромосомі в неушкодженій, усіченій та зміненій формі. На відміну від *S. coelicolor* практично всі вставки елементів в *S. albus* знаходяться в області серцевини. Таким чином, повний розподіл рухомих елементів може свідчити про нещодавні геномні зміни. З 40 передбачених кодуєчих послідовностей транспозази 17 утворюють прості елементи вставки, а решта необмежені інвертовані повтори. Більшість з них належать до 2 сімей, таких як елементи, подібні до IS112 та IS1647.

Зокрема, 30 передбачуваних генів транспозази лежать зліва від *oriC* і співвідносяться з більшою варіацією складу GC -вмісту ДНК у лівій половині хромосоми (Рис. 3.2). Високий ступінь горизонтального переносу генів можна спостерігати 370 *bp* лівіше *oriC*, що являє собою область, яка містить нижче середнього GC-вміст і множинні вставки рухомих елементів.

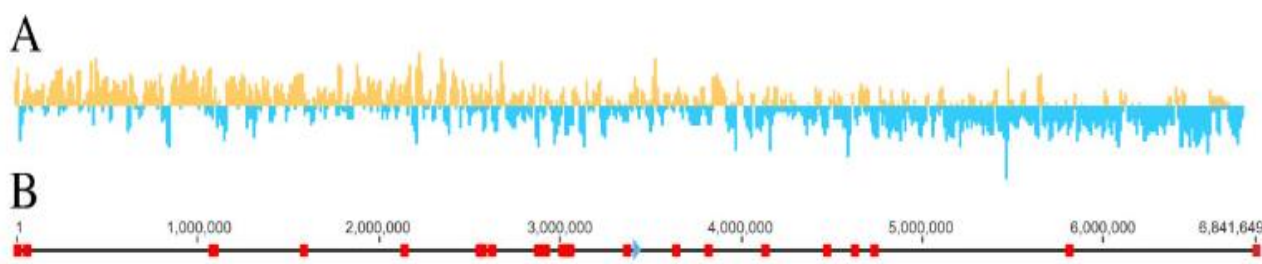


Рис.3.2. Особливості лінійної хромосоми *S. albus* J1074. (А) GC-уклін хромосоми, що показує перевагу С над G (жовта зона) та G над С (синя зона) в аналізованому ланцюзі. (Б) Розподіл рухомих елементів. Початок реплікації позначений синім трикутником.

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу

Механізм експресії генів для комплексу антибіотиків Стрептофунгін недостатньо вивчений. Розглянемо механізм експресії генів, відповідальних за синтез антибіотику ногаламіцину. Продуцентом протипухлинного антибіотика ногаламіцину є *Streptomyces nogalater* IMET43360, що належить до групи антрациклінових полікетидів. Він складається з полікетидного аглікону, глікозильованого цукровими залишками ногалози та ногаламіну. Ногаламіцин є активним щодо грам-позитивних бактерій, а також низки пухлинних ліній [27].

У хромосомі *S. nogalater* ідентифіковано ген *snorA* [28]. Продукт гена *snorA* має високий ступінь гомології з регуляторними білками SARP-родини (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein), що контролюють біосинтез антибіотиків у низки стрептоміцетів [29]. Найближчим гомологом виявився регулятор біосинтезу доксорубіцину *DnrI* у *S. peucetius subsp. caesi* (63 % ідентичності, 72 % гомології). Цей білок є транскрипційним фактором, що взаємодіє з короткими ділянками ДНК та з РНК-полімеразою, активуючи експресію низки структурних генів біосинтезу доксорубіцину. Вторинна та третинна структура *DnrI* добре вивчена, відомі домени, задіяні у

розпізнаванні та зв'язуванні ДНК і РНК–полімеразою. З огляду на високу гомологію між продуктом гена *snorA* та позитивними регуляторами родини SARP, ідентифікованих в геномах *S. peucetius subsp caesius*, а також *S. echinatus* DSM40730, було вирішено здійснити його гетерологічну експресію у цих штамів. Для цього використали плазмиду рКСЕА [30], у якій ген *snorA* клоновано під контролем конститутивного промотора гена резистентності до еритроміцину *S. erythraea*. Плазмиду рКСЕА перенесено у клітини досліджуваних актиноміцетів за допомогою кон'югації з *E. coli* ET12567 та отримано рекомбінантні штами, що містять копії гена *snorA*.

Зростання рівня синтезу доксорубіцину при введенні додаткових копій *snorA* можна пояснити високою гомологією *DnrI* та *SnorA*, а отже і здатністю останнього активувати транскрипцію структурних генів біосинтезу антибіотика. Досліджено вплив цього гена на рівень синтезу ногаламіцину штамом *S. nogalater* SRN73. Цей штам є УФ–індукованим похідним *S. nogalater* IMET43360 та характеризується вищим рівнем синтезу антибіотика порівняно із диким типом. З цього можна зробити висновок, що при перенесенні плазмиди рКСЕА у клітини *S. nogalater* SRN73 стане можливим отримання штаму з дуже високим рівнем синтезу ногаламіцину.

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму

3.2.1. Використання природного та штучного добору отримання промислових продуцентів

Добір поділяється на природний та штучний. Природний добір – виживання та розмноження найпристосованіших до умов існування організмів певного виду. Природний добір діє через збереження і нагромадження корисних для популяцій і виду вцілому спадкових змін, створюючи нові, краще за інших пристосовані до середовища особини, які залишають потомство. При використанні цього методу необхідно вилучити природний штам мікроорганізму для подальшої роботи з ним. Завдяки

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

виділенню мікроорганізмів із природних середовищ було отримано та ідентифіковано більшість існуючих видів стрептоміцетів.

Для отримання продуцента проводиться відбір проб з тих місць, де їх знаходження найбільш вірогідне. Зразки проб вносять в рідкі селективні середовища спеціального складу. В них створюються умови для розвитку продуцента. Так отримують накопичувальні культури мікроорганізмів. Після отримання накопичуваної культури приступають до виділення чистої культури. Необхідно робити посів розбавленої суспензії клітин накопичуваної культури на щільне середовище для того щоб отримати окрему колонію з кожної. Кожна колонія містить клітини, які розвиваються від однієї клітини, і є чистою культурою.

Штучний добір – створення нових або поліпшення наявних штамів мікроорганізмів шляхом систематичного збереження особин з певними спадковими ознаками і властивостями в кількох поколіннях. В процесі добору фенотипна мінливість організмів зростає, а їхня загальна життєздатність знижується. Метод природного та штучного добору засновані на тому, що необхідно отримати форму мікроорганізмів, яка повинна бути набагато пристосована у середовищі, ніж початкова культура. Необхідно створювати оптимальні умови культивування. [31]

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Використання індукованого мутагенезу збільшує частоту мутацій мікроорганізмів при штучному пошкодженні генома. Індукований мутагенез відбувається під дією різних фізичних або хімічних чинників. Фізичні чинники – ультрафіолетове та йонізуюче випромінювання, низька або висока температура. До найбільш поширених хімічних мутагенів відносяться азотиста кислота, акридинові барвники, алкілюючі сполуки, бром урацил та інші. Позитивний ефект будь-якого мутагена в селекції рослин залежить не тільки від його мутагенної дії, але також від його мутагенної ефективності. Ефективний мутагенез є продуктом максимальних бажаних змін,

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

супроводжуваних найменш можливими небажаними змінами. Дієвість і ефективність є двома різними властивостями мутагенів.

Дієвість зазвичай означає швидкість точкових мутацій щодо дози, тоді як ефективність відноситься до швидкості точкових мутацій щодо інших біологічних ефектів, індукованих мутагенів, і вважається мірою ушкодження. Важливим кроком є вибір ефективного мутагена і дози, яка буде використовуватися. Краща та доза, яка викликає велику мінливість в будь-якій культурі. Мутагени в низьких дозах викликають стимуляцію життєвих процесів, надають модифікуючий, а іноді навіть мутагенний ефект.

Необхідно застосовувати дози, які будуть забезпечувати виживання клітин у проміжку від 0,1 до 50 – 80%. Завдяки мутагенів, які застосовують частота мутантів підвищується в 100 – 1000 раз, що полегшує роботу по їх виділенню. Продуцент комплексу антибіотику стрептофунгіну *S. albus*, штам UN 44 був одержаний в результаті ступінчастого індукованого мутагенезу при обробці суспензії спор вихідної культури штаму *S. recifensis var. Lyticus* IMB Ас-5001 ультрафіолетовим випромінюванням в дозі 240 Дж/м² та азотистою кислотою (0,5 М NaNO₂) протягом 50 хвилин [33].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

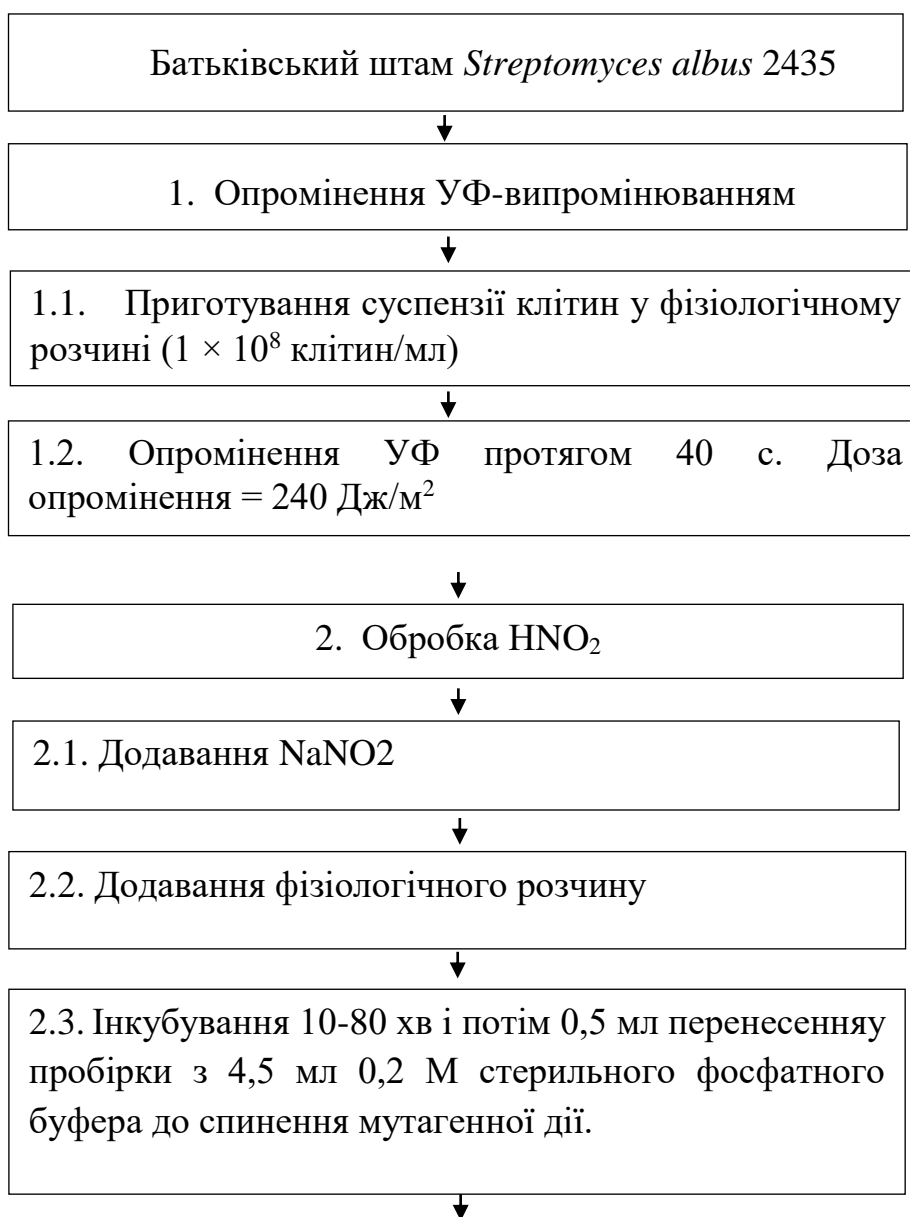
Як батьківський штам був взятий *S. albus* 2435. Батьківський штам піддавали двоступінчастій послідовній обробці мутагенами: УФ-опроміненням та HNO₂ визначеної концентрації. Отриманий мутантний штам вирощували на агарному середовищі Чапека при температурі 28°C протягом 7 днів.

I етап – суспензію спор кількістю 10 мл (1×10⁸ клітин/мл) поміщають у на чашку Петрі з фізіологічним розчином та піддають УФ-опромінення при постійному перемішуванні, час випромінювання 40-50 с. Вплив здійснюється УФ-лампою з довжина хвилі 254-255 нм та дозою 240 Дж/м². Всі маніпуляції проводять в темній кімнаті для уникнення фотореактивації.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

II етап – обробка суспензії спор азотистою кислотою. 0,2 мл суспензії спор (1×10^8 клітин / мл) в фізіологічному розчині змішували з 5,6 мл 0,2М оцтового буферу (рН 4,4 - 4,6) та 0,2 мл NaNO₂ різної концентрації (0,5, 1, 2, 3 М). 0,2 мл фізіологічного розчину додавали до контрольного зразка замість мутагену. Зразки інкубували протягом 10- 80 хв і потім 0,5 мл переносили у пробірки до спинення мутагенної дії. Розчин культивували на чашках Петрі з агаровим середовищем Чапека та підраховували рівень виживання клітин. [34]

Блок-схема отримання продукенту:



Відбір високоактивних мутантів



Промисловий штам продуценту комплексу
антибіотиків *S. albus* UN44

Рис. 3.3. Схема отримання продуцента *S. albus* UN44

3.4 Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента

Технологічний процес виробництва Стрептофунгіну починається зі стадії виробничого біосинтезу. Найважливіше на цьому етапі є забезпечення таких умов, щоб продуцент максимально нарощував біомасу та щоб спостерігався максимальний ріст.

Ферментер для культивування оснащений механічним перемішуючим пристроєм, який забезпечує оптимальну частоту обертання і підходить для перемішування культуральної рідини середньої густини, що містить міцелій стрептоміцету. Ферментер оснащений барботером та сорочкою, в яку подають теплоносії (вода), для підтримання сталої температури. Нарощена біомаси не потребує очистки, але потребує виділення. Виділення біомаси доцільно проводити центрифугуванням. Найкраще виділення біомаси спостерігається при правильній швидкості подачі рідини. Швидкість обертання валу центрифуги має бути 10 000 об / хв. Після центрифугування необхідно зробити клітинну суспензію з вмістом клітин 25-30 % для того, щоб подати її на сушку для отримання цільового продукту – порошку Стрептофунгін.

Сушіння проходить в сушарці розпилюючого типу. Розпилювальне сушіння є дуже поширеним методом одержання продуктів мікробіологічного синтезу з нативних розчинів, так як воно є досить швидше і висушування відбувається протягом декількох секунд. Суспензія висушуваного матеріалу безперервно подається зверху на відцентровий механізм і розпилюється на частинки розміром 60—70 мкм.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

Препарат для рослинництва Стрептофунгін може бути представлений у двох формах : рідина і сухий порошок. Було обрано суху форму препарату, оскільки вона містить декілька переваг. Порошок, на відміну, від рідини краще зберігається та має більший термін придатності, що є не мало важливим.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцева продукція виробництва являє собою препарат захисту рослин від мікробних фітопатогенів, діюча речовина – комплекс антифунгальних антибіотиків, отриманий шляхом біосинтезу штамом-продуцентом *Streptomyces albus* UN 44. [36] Продукція призначена для захисту рослин від мікробних патогенів.

Склад препарату:

1. Висушена біомаса клітин продуценту – 60%.
2. Залишки поживного середовища – 40%
 - антибіотичні сполуки – 5%
 - ферменти
 - білки
 - продукти метаболіту

Зовнішній вигляд продукції: нестерильний жовтуватий порошок, нерозчинний у воді. [36] Форма випуску: поліетиленові пакети по 0,5 кг. Для виготовлення пакетів застосовують поліетиленову плівку по ГОСТ 10354.

Упаковка: пакети укладають в стопи. Стопи пакетів пресують і скріплюють стрічкою із плівкових матеріалів, поліетиленовою стрічкою з липким шаром згідно з ГОСТ 20477 або будь-яким обв'язувальним матеріалом. Стопи пакетів загортають в обгортковий папір згідно з ГОСТ 8273 та укладають в ящики з гофрованого картону по ГОСТ 9142. Маса ящика з пакетами не повинна перевищувати 20 кг. Маркування пакувальних матеріалів, нанесене печаткою або тисненням, повинне бути чітким, стійким до дії світла (вигорання) і видалення [38]. Кожна пакувальна одиниця споживчої та групової тари повинна мати етикетку з паперу етикетного

					ДП 6214. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив	Тараман Ю.В.						
Консульт.							
Керівник	Тодосічук Т.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	39	80
					НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		

(ГОСТ 7625-86) або паперу письмового (ГОСТ 18510-87), виготовлену поліграфічним способом друку (ТУ У 21521832.001) або тисненням із зазначенням наступних позначень:

- товарний знак і назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;
- назва продукту;
- дата виготовлення;
- умови зберігання;
- термін придатності до споживання;
- маса нетто порошку (в г);
- кількість пакувальних одиниць (для групової тари);
- позначення технічних умов.

Транспортують кінцевий продукт в закритих транспортних засобах і контейнерах (ГОСТ 20435) всіма видами транспорту у відповідності з правилами перевезень, що діють на відповідний вид транспорту і додатковими вимогами, вказаними в документі на кінцевий продукт. Транспортне маркування здійснюється із нанесенням маніпуляційного знаку “Оберігати від вологи!”. Отриманий препарат зберігають у сухих чистих і добре вентильованих складських приміщеннях при температурі не вище +25 °С і відносній вологості повітря не більше 75 %.

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов’язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітки
1	2	3	4
1. Основна сировина			

1.1. Агар	ГОСТ 17206-84	Зовнішній вигляд: пористі пластини, товщиною не більше 20мм., Колір: білий чи світло-кремовий. Запах: характерний. Прозорість розчину з масовою часткою агару 0,85%: не менше 50.	Компонент ПС для відновлення музейної культури
1.2. Борошно соеве	ГОСТ 3898-56	Вологість не більше 9%, вміст білку 10-12%	Компонент поживного середовища
1.3. Глюкоза	ГОСТ 6038-79	Зовнішній вигляд: білий кристалічний порошок. Смак: солодкий, без сторонніх присмаків. Запах: характерний, без сторонніх запахів.	Компонент поживного середовища
1.5. Хлорид натрію	ГОСТ 4233-77	Масова доля NaCl в прожареному препараті: не менше 99,9%.	Компонент поживного середовища
1.6. Калій фосфорнокислий двозаміщений 3- водний	ГОСТ 2493-75	Масова частка калію фосфорнокислого двозаміщеного 3- водного не менше 99%	Компонент поживного середовища
1.7. Кальцій хлористий	ГОСТ 450-77	Масова частка кальцію хлористого не менше 90%	Компонент поживного середовища
1.8. Магній сірчаноокислий 7- водний	ГОСТ 4523-77	Масова частка магнію сірчаноокислого 7- водного не менше 99%	Компонент поживного середовища
1.9. Марганець (II) хлористий 4- водний	ГОСТ 612-75	Масова частка марганцю (II) хлористого 4-водного не менше 98%	Компонент поживного середовища
1.10. Крохмаль картопляний гідролізований	ДСТУ 4380:2005	Масова частка вологи не більше 15%	Компонент поживного середовища

1.11. Магній хлористий	ГОСТ 55067-2012	Масова частка магнію хлористого не менше 97%	Компонент поживного середовища
1.12. Пропінол Б	ТУ 6-14-300-80	Згідно вимогам ТУ	Компонент поживного середовища

2. Допоміжна сировина

2.1. Вода питна	ДСанПіН 2.2.4-171-10	рН 6,0-9,0; хлориди - не більше 350 мг/дм ³ ; жорсткість загальна - не більше 7 моль/дм ³	Для мийки і ополіскування обладнання, приготування поживних середовищ
2.2. Засіб миючий синтетичний порошкоподібний	ГОСТ 25644-96	Вміст активного хлору 4,86%	Для мийки обладнання та приміщень
2.3. Кислота соляна	ГОСТ 3118-77	Масова частка соляної кислоти не менше 35-38%	Для регулювання кислотності культуральної рідини
2.5. Перекис водню	ГОСТ 177-88	Масова частка перекису 30%-40%	Для дезинфекції обладнання та приміщень

3. Матеріали

3.1. Поліетиленові пакети	ГОСТ 12302-2013	Маркування, цілісність	Пакування готової продукції
---------------------------	-----------------	------------------------	-----------------------------

3.2. Поліетиленова стрічка	ГОСТ 20477	Маркування, цілісність	Пакування готової продукції
3.3. Транспортні пакети	ГОСТ 26663	Маркування, цілісність	Пакування готової продукції

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Санітарно-медичне обстеження

Даний етап здійснюється, направляючи працівника до медичного закладу, для проходження санітарно-медичного обстеження при надходженні працівника на роботу на виробництво та 1 раз на рік обов'язково. Щодня відповідальна людина має візуально чи, за необхідності, з використанням певних засобів перевіряти стан здоров'я працівника, що прийшов на роботу.

ДР 1.1.2. Навчання персоналу

Перед початком роботи на виробництві працівник зобов'язаний прочитати, вивчити та здати атестацію з інструкцій, документів по роботі, яку цей працівник безпосередньо буде виконувати, правил роботи та поведінки у виробничих приміщеннях, лабораторіях.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів

Для приготування робочих розчинів використовують мийні, дезінфекційні та антисептичні засоби, які в установленому порядку зареєстровані в Україні і дозволені до використання МОЗ України на підприємствах хіміко-фармацевтичної промисловості.

ДР 1.2.1. Приготування перекису водню

Для приготування 3% розчину H_2O_2 , як вихідну речовину, беруть 30% H_2O_2 згідно ГОСТ 177-88 «Перекис водню. Технічні умови», що являє собою прозору рідину. Згідно формули 1.2.1, наведеної вище, на 1 л розчину необхідно відміряти 100 мл 30% H_2O_2 . У ємність на 10 л наливають 1/3 необхідної кількості води питної, додають розраховану кількість 85% H_3PO_4 ,

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

ретельно перемішують. Далі додають решту води питної, щільно закривають ємність кришкою та перемішують. Готовий розчин має термін придатності 24 год.

ДР 1.2.2. Приготування розчину миючого засобу.

Мірною склянкою відміряють 50 г синтетичного мийного засобу, розчиняють у невеликій кількості води і доводять до 10 л теплою водою (45 ± 5) °С. Зберігають протягом 14 діб у закритій тарі. Отриманий миючий розчин використовується для обробки виробничих приміщень та мийки вузлів обладнання.

ДР 1.3. Підготовка приміщень

ДР 1.3.1. Підготовка лабораторій

Прибирання здійснюють методом протиранням поверхонь приміщення стерильним mopом (або серветкою), змоченим спочатку у мийному, а після змивання мийного розчину водою очищеною, у дезінфікуючому розчині. Після дезінфекції всіх поверхонь приміщення, необхідно знову промити приміщення водою очищеною.

ДР 1.3.2. Підготовка виробничих приміщень

Прибирання проводиться виробничим персоналом та прибиральниками виробничих приміщень. Роботу виконує персонал, що забезпечений спецодягом, взуттям та гумовими рукавицями, за допомогою прибирального інвентарю з використанням мийних та дезінфікуючих засобів, які готують у ємності об'ємом до 10 л. Прибирання здійснюють методом протиранням поверхонь приміщення стерильним mopом (або серветкою), змоченим спочатку у мийному, а після змивання мийного розчину водою очищеною, у дезінфікуючому розчині. Після дезінфекції всіх поверхонь приміщення, необхідно знову промити приміщення водою очищеною.

ДР 1.4. Підготовка обладнання і комунікацій

ДР 1.4.1. Мийка обладнання і комунікацій

Спосіб мийки обладнання залежить від виду обладнання, наприклад, реактори миють за допомогою СІП-мийки, а миття з'ємних частин

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

обладнання здійснюють вручну. Для ручного миття беруть відро об'ємом до 10 л, у яке попередньо відливають необхідну кількість мийного розчину (від ДР 1.3.1) підігрітого до 40-45° С. Миття обладнання здійснюють шляхом очищення внутрішніх та зовнішніх стінок за допомогою змоченої у мийний розчин серветки або щітки, після кожного виробничого циклу.

Миття за допомогою СІП-мийки здійснюється автоматично; у бак заливають необхідну кількість мийного розчину (від ДР 1.3.1), встановлюють температуру миття $65 \pm 5^\circ \text{C}$ та час експозиції 30 хв.

ДР 1.4.2. Дезінфекція обладнання і комунікацій

Дезінфекція обладнання здійснюється за допомогою дезінфікуючих засобів. Спосіб дезінфекції обладнання залежить від виду обладнання. Для ручного миття беруть відро об'ємом до 10 л, у яке, попередньо, відливають необхідну кількість дезінфікуючого розчину. Дезінфекцію обладнання здійснюють шляхом очищення внутрішніх та зовнішніх стінок за допомогою, змоченої у дезінфекційний розчин, серветки або щітки, після кожного виробничого циклу.

ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання і комунікацій

Стерилізація реакторів та з'ємних частин обладнання проводиться термічною стерилізацією водяною парою з тиском 0,28-0,3 МПа та при температурі 130-135 °С, протягом 1 год.

ДР 2. Підготовка повітря.

ДР 2.1. Підготовка вентиляційного повітря.

ДР 2.1.1. Забір повітря

Залежно від пори року, місця забору, повітря міститиме різну кількість аерозольного забруднення, тому забір атмосферного повітря здійснюють через повітря забірний пристрій у найвищій точці на висоті 10 м.

ДР 2.1.2. Механічна очистка повітря

Повітря потрапляє у фільтр грубої очистки типу G4, в якому звільняється від пилу і механічних частинок, та забезпечує ступінь очистки 80%.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

ДР 2.1.3. Нагнітання повітря

При проходженні через вентилятор при тиску 0,2 МПа відбувається нагнітання повітря.

ДР 2.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря

Через вентилятор повітря надходить до нагрівальної колонки, де відбувається усереднення та стабілізація фізико-хімічних показників повітря до температури 20°C та вологості 40-60%. Відбувається очистка повітря від дрібних частинок пилу та мікроорганізмів, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки.

ДР 2.2. Підготовка стерильного повітря.

ДР 2.2.1. Забір повітря

Залежно від пори року, місця забору, повітря міститиме різну кількість аерозольного забруднення, тому забір атмосферного повітря здійснюють через повітря забірний пристрій у найвищій точці на висоті 10 м.

ДР 2.2.2. Нагнітання та механічна очистка повітря

Повітря потрапляє у фільтр грубої очистки типу G4, в якому звільняється від пилу і механічних частинок, та забезпечує ступінь очистки 80%. Повітря нагнітається за допомогою насосу.

ДР 2.2.3. Охолодження повітря

Після компресора повітря проходить через теплообмінник-охолоджувач, в результаті охолодження повітря до 25-30° С відбувається конденсація вологи ($W = 60-70\%$), яка вловлюється ресивером-вогловідділювачем, після проходження якого згладжується пульсація тиску.

ДР 2.2.4. Очищення повітря на головному фільтрі

Нагріте повітря надходить до головного фільтра (Ф-12), у якому забезпечується ступінь очищення 95%.

ДР 2.2.5. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Стиснене повітря поступає на лінію подачі стисненого повітря, проходячи крізь повітряні стерилізуючі фільтри з діаметром пор 0,22 забезпечуючи ступінь очищення 99,999 %.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

ДР 3. Підготовка поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування поживного середовища для посівного матеріалу

Посівний матеріал вирощують спочатку у колбах об'ємом, а потім – у інокуляторі. Для вирощування посівного матеріалу, приготування поживного середовища з наступною його стерилізацією проводять в інокуляторі. В інокулятор завантажують питну воду у визначеному об'ємі. При перемішуванні додають всі необхідні компоненти середовища у відповідній кількості за допомогою дозатора. Перемішування проводять протягом 30 хв при 30-40 об/хв після внесення всіх компонентів середовища.

ДР 3.2. Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу

Для даного процесу відбувається стерилізація поживного середовища «гострою» парою у стерилізаторі. Гомогенізоване поживне середовище завантажується у стерилізатор, де створюється такий температурний режим: температура 125°C, тиск 0,1 МПа, тривалість 1 год. Із стерилізатора середовище по трубах подається на процеси культивування.

ДР 3.3. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу

В якості середовища для проведення виробничого біосинтезу було вибрано середовище наступного компонентного складу, г/л: соєве борошно - 8,0; крохмаль картопляний гідролізований - 10,0; NaCl - 14,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 2,0; $MgCl_2$ - 2,2; $CaCl_2$ - 2,0; $MnCl_2 \times 4H_2O$ - 0,04; пропінол Б-400. рН = 7,8-8,2.

Приготування поживного середовища з наступною його стерилізацією проводять у ферментері. У ферментер завантажують попередньо приготований та простерилізований у реакторі-змішувачі екстракт соєвого борошна визначеного об'єму. При перемішуванні (30-40 об/хв) завантажують всі необхідні компоненти середовища у відповідній кількості за допомогою дозатора. Перемішування проводять протягом 30 хв після внесення всіх компонентів середовища.

ДР 3.4. Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Для даного процесу відбувається стерилізація поживного середовища «гострою» парою у стерилізаторі. Гомогенізоване поживне середовище завантажується у стерилізатор, де створюється такий температурний режим: температура 125°C, тиск 0,1 МПа, тривалість 1 год. Із стерилізатора середовище по трубах подається на процеси культивування.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу.

*ТП 4.1. Відновлення музейної культури *S. albus* UN 44*

Вміст флакона із кріоконсервованою культурою висівають у стерильних умовах у пробірки із твердим поживним середовищем та інкубують в термостаті при температурі 28°C протягом 120 годин. Після цього візуально оцінюють культуральні властивості (розмір, форму, краї, поверхню, колір, прозорість колоній), мікроскопічні та морфологічні ознаки продуценту, перевіряючи мікробіологічну чистоту.

ТП 4.2 Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

У пробірки із посівним матеріалом на твердому поживному середовищі вносять по 2 мл стерильного поживного середовища та перемішують для утворення суспензії клітин, після чого суспензію кількісно переносять у стерильних умовах у колби із стерильним поживним середовищем. Середовище для вирощування посівного матеріалу: глюкоза – 6,0; соєве борошно дезодороване – 8,0; NaCl – 14,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; CaCl₂ – 4,5; MgSO₄×7H₂O – 5,8; MnCl₂×4 H₂O - 0,04. Колби вносять у термостат, встановлюють їх на качалки із частотою обертання 220-290 об/хв та інкубують протягом 48 год при температурі 28°C.

ТП4.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Посівний матеріал із колб по закінченню інкубування в термостаті перекачується у інокулятор із простерилізованим поживним середовищем. Процес в інокуляторі відбувається за температури 28°C, протягом 48 годин. Інокулятор оснащений механічним перемішуючим пристроєм – відкритою

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

турбінною мішалкою із частотою обертання 220 об/хв та барботером, що забезпечує значну аерацію технологічним повітрям.

ТП 5. Виробничий біосинтез

Виробниче культивування відбувається у ферментері. Коефіцієнт заповнення ферментару складає 0,6. До ферментеру посівний матеріал додається в об'ємі 10% від об'єму поживного середовища. Ферментер оснащений механічним перемішуючим пристроєм – відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання $3,33\text{ с}^{-1}$, що забезпечує необхідні умови проведення біосинтезу та створення потоків масо- та енергообміну. Виробничий біосинтез протікає при 28°C протягом 72 годин.

Після завантаження культури у ферментер вміст апарату перемішують за допомогою мішалки протягом 2 хвилин та відбирають у стерильну ємність певний об'єм культури для досліджень мікробіологічної чистоти.

ТП 6. Відділення біомаси

Охолоджену культуральну рідину надалі потрібно направити на центрифугування, тобто відділення біомаси при 10 000 обертів на хвилину. Біомасу клітин продуцента переводять у суспензію з вмістом клітин 25-30 % та відправляють на стадію сушіння, а фугат до ЗВ10 на знешкодження.

ТП 7. Сушіння препарату

Сушіння проходить в сушарці розпилюючого типу. Розпилювальне сушіння є дуже поширеним методом одержання продуктів мікробіологічного синтезу з нативних розчинів, так як воно є досить швидше і висушування відбувається протягом декількох секунд. Суспензія висушуваного матеріалу безперервно подається зверху на відцентровий механізм і розпилюється на частинки розміром 60—70 мкм.

ПМВ 8. Фасування готового продукту у поліетиленові пакети

Фасування порошку препарату для захисту рослин відбувається на автоматичній лінії за допомогою пакувальної машини. Порошок фасується у поліетиленові пакети по 0,5 кг. Кожна пакувальна одиниця повинна мати етикетку з паперу етикетного (ГОСТ 7625-86)

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПМВ 9. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту

Пакети з препаратом пакують у вторинну тару - пакети укладають в стопи. Стопи пакетів загортають в обгортковий папір згідно з ГОСТ 8273 та складають в ящики. Маркування пакувальних матеріалів, нанесене печаткою або тисненням.

ЗВ 10. Знешкодження відходів та промислових викидів

На виробництві відходи сортуються на папір, скло, пластик, органічні відходи, відпрацьована вода. Папір, скло та пластик, органічні відходи передаються щотижня на відповідні переробні заводи для уникнення контамінації цими предметами навколишнього середовища. Відпрацьована вода, що підлягає переробці, очищується на підприємстві за допомогою відповідних фільтрів очистки води для створення, чистої питної води, дистильованої води та води, вільної від часток.

ПВ 11. Переробка відходів

Фільтрувальні матеріали та органічні розчинники можуть повторно використовуватися при належній їх обробці. Відновлення тканинних фільтрів, що використовуються при підготовці води та повітря, відбувається за рахунок вимочування їх в гарячій воді з подальшим чищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва для стадії біосинтезу виробництва наведений в таблиці 4.2. Баланс складено для стадії, що проходить у ферментері об'ємом 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6, тому розрахунок проводився для об'єму 1,8 м³.

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс стадії біосинтезу виробництва

Використано		Отримано	
Назва сировини, матеріалів та	Кількість	Назва кінцевого продукту або	Кількість

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

напівпродуктів			напівпродуктів, відходів та втрат		
	л	шт		л	шт
1	2	3	4	5	6
Стадія ТП 5					
Соєве борошно	12,961		Культуральна рідина	1620	
Крохмаль картопляний гідролізований	16,2		Втрати	180	
Натрій хлорид	22,68				
Калій фосфорнокислий двозаміщений 3- водний	3,24				
Магній хлорид	3,562				
Кальцій хлорид	3,238				
Марганець (II) хлористий 4-водний	0,0647				
Пропінол Б	0,0226				
Посівний матеріал	180				
Вода питна	1558,04				
Всього	1800		Всього	1800	
Стадія ТП 6					
Культуральна рідина	1620		Суспензія біомаси клітин	486	
			Фугат	1134	
Всього:	1620		Всього:	1620	
Стадія ТП 7					
Волога біомаса	486		Суха біомаса	386	
			Вода	90	
			Втрати 2%	10	
Всього:	486		Всього:	486	

Стадія ПМВ 8					
Суша біомаса	386		Фасований препарат (0,5 кг в пакеті)	386	772
П/е пакети		772			
Всього:	386	772	Всього:	386	772

4.5. Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється з метою отримання якісного продукту, що відповідає наведеним вище вимогам. Основні точки, параметри контролю та межі їх змін подані в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3. Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень К _т	Вміст мікроорганізмів у повітрі	Методами мікробіологічного аналізу	Кожну операцію	Кількість м/о ≤ 500 од/м ³ ,
ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря К _т ДР 2.2 Підготовка стерильного повітря К _т	Температура	Термометр	Протягом процесу Протягом процесу	20°C
	Вологість	Психрометр технічний		W=40-60%
	Тиск	Манометр		Стале задане значення
ДР 3. Підготовка поживних середовищ К _т , К _{мб}	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Температура кінцева	Термометр	Кожну операцію	30°C
	Стерильність	Висів на чашки Петрі та інкубування		Відсутня стороння мікрофлора

	Температура, тиск	Термометр, манометр, годинник		125°C, 0,1 МПа, 15 хв.
ТП 4. Підготовка посівного матеріалу К _т , К _{мб}	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28°C
	Тривалість культивування	Годинник	Постійно протягом процесу	48 год.
	Тиск в інокуляторі	Манометр		0,01 МПа
	Стерильність	Висів на чашки Петрі, візуально	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 5. Виробничий біосинтез К _т , К _{мб}	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі та інкубування	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28°C
	Тиск у ферментері	Манометр		0,01 МПа
	Тривалість культивування	Годинник		72 год
ТП 6. Відділення біомаси К _т	Тривалість процесу	Годинник	Постійно протягом процесу	30 хв
	Швидкість обертання ротору	Тахометр		10 тис.об/хв
ТП 7. Сушіння препарату К _т	Тривалість процесу	Годинник	Постійно протягом процесу	10-15 с
	Температура	Термометр		200°C
ПМВ 8. Фасування готового продукту у пакети К _т	Маса у пакеті	Автоматично	Кожну операцію	0,5 кг

ПМВ 9. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту К _т	Кількість стопів у ящику	Візуально	Кожну операцію	Не більше 20 кг ящик
ЗВ 10. Знешкодження відходів та промислових викидів К _х	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікробіологіч ний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для даного матеріалу чи речовини
ПВ 11. Переробка відходів, К _х К _т	Наявність хімічних, м/б аналіз	Кількісний хімічний та м/б аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Для проведення процесу біосинтезу препарату для захисту рослин Стрептофунгін використовуємо ферментер з механічним перемішуючим пристроєм та барботером. Ферментери - найбільш специфічні апарати мікробіологічного виробництва. Для досягнення максимальної ефективності біосинтезу виробничий ферментер повинен задовольняти основні вимоги щодо культивування клітин: забезпечити термостатування мікробної суспензії в кожній точці ферментаційного середовища; забезпечити підтримання оптимальних робочих параметрів в кожній точці робочого об'єму; забезпечити необхідний рівень аерації, перемішування; забезпечити високий рівень автоматизації процесу культивування, техніки безпеки та охорони праці персоналу [39].

Критерієм для вибору конструкції ферментеру є вимоги технології біосинтезу цільового продукту, а саме:

- інтенсивність перемішування реагентів;
- агрегатний стан реагуючих речовин, продуктів і консистенція реакційної маси;
- температура реакції і тиск;
- тепловий ефект і інтенсивність теплообміну;
- хімічні властивості речовин, що переробляються;

					ДП 6214. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Тараман Ю.В.			РОЗДІЛ 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.		Фесенко С.В.				Д	55	80
Керівник		Тодосійчук Т.С.						
Затвер.						НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		

- задана продуктивність апарату;
- безперервність або періодичність процесу;
- простота конструкції. [40]

Ферментери для аеробних процесів біосинтезу класифікують за конструкцією та за одним з трьох способів введення енергії:

1. При використанні механічних пристроїв обертового або іншого типу руху.
2. Пневматичне перемішування стисненим газом.
3. Енергія насосу, що забезпечує рух рідинної фази у зовнішньому циркуляційному контурі [39].

Найчастіше використовуються біореактори першого типу. Вони мають наступний ряд переваг:

- дозволяють легко змінювати технологічні умови;
- забезпечують ефективну доставку газу до клітин;
- завжди є у продажі;
- використовуються для вирощування різних мікроорганізмів.

Оскільки комплекс антибіотиків є екзогенними метаболітами, виробниче культивування необхідно проводити в режимі глибинного культивування у ферментерах невеликого об'єму при механічному перемішуванні та аерації. Враховуючи особливості стадії біосинтезу було обрано конструкцію ферментера об'ємом 3 м³ із механічним перемішувачем (відкритою турбінною мішалкою) та барботером.

На рисунку 5.1 показано схему обраної конструкції ферментера. Ферментер оснащений системою мийки та стерилізації насиченою водяною

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

парою. Підведення стерильного повітря здійснюється через барботер. Для регулювання температури культивування використовується зовнішня сорочка.

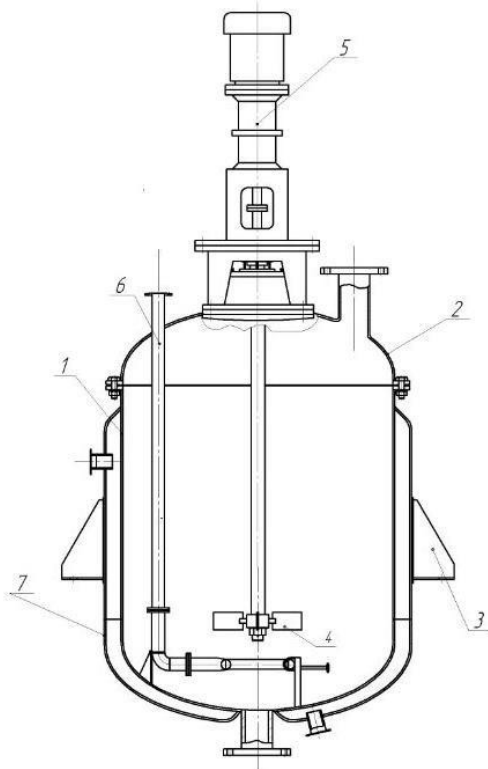


Рис.5.1. Схема ферментера: 1- корпус, 2 - кришка, 3 – опори, 4 – перемішуючий пристрій, 5 – привод, 6 – барботер, 7 – сорочка.

Даний апарат можна використовувати для вирощування, за потребою, широкого спектру мікроорганізмів. Це класичний ферментер, в якому передбачена, за необхідності, подача повітря барботером для аерації середовища культивування, та інтенсифікація перемішування з диспергуванням повітря перемішуючим пристроєм.

Даний ферментер призначений для глибинного культивування мікроорганізмів у стерильних умовах у технологічній лінії мікробіологічного синтезу. Перемішуючі пристрої можна поділити на тихохідні та швидкохідні. До тихохідних мішалок належать лопатеві, якірні, рамні. До швидкохідних належать пропелерні та турбінні мішалки різних типів, а також спеціальні типи мішалок. Важливим показником, який потрібно враховувати при виборі

мішалки є фізичні показники рідини, що перемішується, в першу чергу - її в'язкість. Для малов'язких рідин, звичайно, використовують швидкохідні мішалки, для високов'язких – тихохідні. Для перемішування рідин з низькою і середньою в'язкістю використовують турбінні мішалки з прямими лопатками або пропелерні мішалки.

За способом закріплення валу мішалки можна поділити на: мішалки з вертикальним валом, з горизонтальним валом, бічного монтажу, погрузні мішалки, переносні та донні мішалки, а також мішалки спеціального застосування. Традиційний вигляд обладнання для перемішування - апарат з вертикальним валом. Така конструктивна схема є найбільш раціональною.

Турбінні мішалки призначені для розчинення, емульгування рідин, переведення в завислий стан кристалічних і аморфних твердих частинок при їх концентрації до 80%, переведення в завислий стан волокнистих частинок при їх концентрації до 5%, емулювання твердих частинок при їх концентрації до 60%, і розмірі до 0,15 мм, вирівнювання температури.

Відкриті турбінні мішалки (рис.5.2) представляють собою, по суті, вдосконалену конструкцію простих лопатевих мішалок. Обертання декількох лопатей створює поряд з радіальними потоками осьові потоки рідини, що сприяє інтенсивному перемішуванню її у великих обсягах. Інтенсивність перемішування зростає при установці в посудині відбивних перегородок.

Переваги турбінних мішалок:

1. Швидкість перемішування і розчинення;
2. ефективне перемішування в'язких рідин;
3. придатність для безперервних процесів.

Недоліком турбінних мішалок є порівняльна складність і висока вартість виготовлення [41].

Для всіх ферментерів з механічними перемішувачами пристроями характерна наявність уніфікованого конструкційного елемента, що здійснює первинне диспергування газу.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

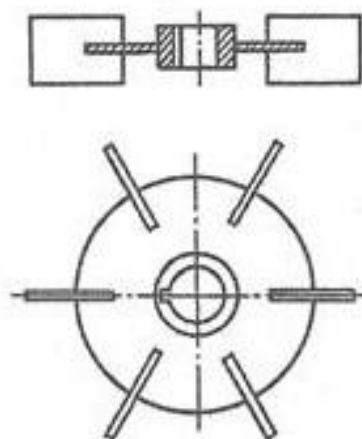


Рис.5.2. Зображення відкритої турбінної мішалки з прямими лопатями

Для всіх ферментерів з механічними перемішувачами пристроями характерна наявність уніфікованого конструкційного елемента, що здійснює первинне диспергування газу.

Функції такого диспергатора виконує барботер.

Принцип роботи барботера зводиться до підведення під шар рідини дрібних бульбашок газу, які потім спричиняють підйом угору часток рідини і тим самим створюють інтенсивне її перемішування. [44] Даний ферментер - вертикальна циліндрична ємність з еліптичними днищами та сорочкою з напівтруб по циліндричній частині корпуса. На верхньому днищі апарата розміщені стійка з мотор – редуктором, торцевим ущільненням і захисним кожухом.

Середовище у ферментері має слабкокисло реакцію, тому сталь має бути стійка до дії кислого середовища; вона не повинна окислюватись і не повинна піддаватись корозії, для того, щоб корозійні часточки не переходили в культуральна рідину і не псували основний продукт. Обираємо високолеговану хромонікелеву нержавіючу сталь марки Х18Н10Т (ГОСТ 5632-72). Перемішувачий пристрій виготовляємо із сталі 14Х17Н2 (ГОСТ 5632-72), деталі зовнішніх пристроїв – із сталі В Ст.3сп.5 (ГОСТ 380-94).

ТЕХНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТЕРУ

1. Ферментер призначений для проведення виробничого біосинтезу препарату для захисту рослин.

2. Об'єм апарата, м³ :

номінальний 3;

робочий 1,8.

3. Площа поверхні теплообміну сорочки, м² 8,5

4. Температура робочого середовища, °C:

у ферментері 28;

в сорочці 45.

5. Тип перемішуючого пристрою — мішалка відкрита турбінна.

6. Кількість мішалок, шт. 1.

7. Частота обертання валу мішалки, с⁻¹ 3,33.

8. Потужність електродвигуна, кВт 1,5.

9. Середовище:

в апараті — нетоксичне, вибухонебезпечне

в сорочці — вода.

10. Робочий тиск, МПа

11. Надлишковий тиск при стерилізації, МПа

12. Тип електродвигуна — мотор-редуктор МН — 5857-66.

13. Маса сухого апарата, кг.

14. Габаритні розміри, мм.

довжина 1920

висота 4970

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

5.2.1. Конструктивний розрахунок

Вихідні дані для розрахунку:

Загальний об'єм апарату:	$V_n = 3 \text{ м}^3$;
Коефіцієнт заповнення:	$K = 0,6$;
Температура:	$t = 28 \text{ }^\circ\text{C}$.
Тип перемішуючого пристрою:	турбінна мішалка.

Теплофізичні характеристики культуральної рідини, яка містить біомасу стрептоміцету, залишки поживного середовища та синтезовані біологічно активні речовини:

Густина:	$\rho = 1003 \text{ кг/м}^3$.
Динамічна в'язкість:	$\mu = 4,41 \cdot 10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$.
Теплоємність:	$c = 2,34 \text{ кДж/(кг}\cdot\text{K)}$.
Теплопровідність:	$\lambda = 0,523 \text{ Вт/м}\cdot\text{K}$.

Розрахунок проводиться за методикою, представленою у навчальному посібнику «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» Ружинська Л.І. [43].

Визначаємо робочий об'єм ферментеру:

$$V_n = \frac{V_p}{K}$$

Звідси:

$$V_n = V_p \cdot K$$

$$V_p = 3 \cdot 0,6 = 1,8 \text{ м}^3$$

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

Внутрішній діаметр апарата приймаємо згідно з нормативним документом ГОСТ 20680-75 для вертикальних апаратів з механічними перемішуючими пристроями [45]:

$$D_{\text{вн}} = 1600 \text{ мм.}$$

Висота корпусу апарата за ГОСТ 20680-75 становить:

$$H = 3050 \text{ мм.}$$

Еліптичні днища за ГОСТ 6533-78 для апарата вказаного діаметра мають наступні характеристики [46]:

внутрішній діаметр	$D_{\text{в}} = 1,6 \text{ м ;}$
висота еліптичної частини	$h_{\text{в}} = 0,4 \text{ м ;}$
висота відбортеної частини	$h_1 = 0,025 \text{ м ;}$
товщина стінки	$s = 0,01 \text{ м ;}$
об'єм днища	$V_{\text{дн}} = 0,584 \text{ м}^3 ;$
маса днища	$m_{\text{дн}} = 137,9 \text{ кг.}$

Знаходимо висоту днища за формулою:

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{в}}$$

$$h_{\text{дн.}} = 0,025 + 0,4 = 0,425 \text{ м.}$$

Висоту рівня рідини в реакторі знаходять за формулою:

$$H_{\text{р}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi D} + h_{\text{дн.}} + h_{\text{в.}}$$

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot (1,8 - 0,584)}{3,14 \cdot 1,6} + 0,025 + 0,4 = 1,39 \text{ м}$$

Повний об'єм ферментера $V_{\text{н}}$ розраховуємо за формулою:

$$V_{\text{н}} = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}}$$

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

звідки знаходимо об'єм циліндричної частини апарату:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 3 - 2 \cdot 0,584 = 1,832 \text{ м}^3.$$

Висота циліндричної частини реактора-змішувача:

$$H_{\text{ц}} = (V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}}) / F_{\text{пер}} = V_{\text{ц}} / F_{\text{пер}};$$

де $F_{\text{пер}}$ – площа перерізу по внутрішньому діаметру, що розраховується за формулою:

$$F_{\text{пер}} = 0,785 \cdot D_{\text{вн}}^2 = 0,785 (1,6)^2 = 2,0 \text{ м}^2.$$

Тоді:

$$H_{\text{ц}} = (V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}}) / F_{\text{пер}} = V_{\text{ц}} / F_{\text{пер}} = 1,832 / 2 = 0,916 \text{ м};$$

Загальна висота апарату без приводу, без штуцерів, без опор складає:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot (h_{\text{в}} + h_1) = 0,916 + 2 \cdot (0,4 + 0,025) = 1,766 \text{ м};$$

Для даного апарату стандартна сорочка має площу теплообміну $F = 8,5 \text{ м}^2$. Її висота складає $H_{\text{юс}} = 1,5 \text{ м}$, згідно таблиці [43].

5.2.2. Розрахунок механічного перемішуючого пристрою

Визначаємо розмір турбінної мішалки :

$$d_{\text{м}} = \frac{D}{4} = \frac{1,6}{4} = 0,4 \text{ м}.$$

Дане значення діаметру мішалки є стандартним.

Визначаємо основні параметри мішалки [43]:

висота лопатей: $h_{\text{м}} = 0,2 \cdot d_{\text{м}} = 0,2 \cdot 0,4 = 0,08 \text{ м};$

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

висота розміщення мішалки:

$$h = 0,4 \cdot d_M = 0,4 \cdot 0,4 = 0,16 \text{ м};$$

відстань до днища апарату:

$$h = d_M \cdot 0,7 = 0,4 \cdot 0,7 = 0,345 \text{ м};$$

коефіцієнт гідравлічного опору мішалки

$$\xi_M = 8,4.$$

$$D = \frac{D}{d_M} = \frac{1,6}{0,4} = 4.$$

Частота обертів мішалки згідно з обраною технологією становить:

$$n = 200 \text{ об/хв} = 3,27 \text{ об/с}.$$

Округлюємо дане значення до стандартного:

$$n = 3,33 \text{ об/с}.$$

5.2.3. Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_M^2 = 1,5 \cdot 1003 \cdot 3,33^3 \cdot 0,4^5 = 569 \text{ Вт}.$$

де K_N - коефіцієнт потужності, $K_N = 1,5$.

5.2.4. Розрахунок потужності привода мішалки

При розрахунку потужності привода мішалки необхідно врахувати потужність, що витрачається в ущільненні вала мішалки та на подолання опору внутрішніх пристроїв реактора.

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях вала мішалки залежить від діаметра вала d_b в місці ущільнення.

Значення d_b можна знайти наближеним співвідношенням:

$$d_b = C \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,4 = 0,0468 \text{ м}.$$

Коефіцієнт C вибирається в залежності від конструкції мішалки за таблицею 1 [43].

Таблиця 1. Значення коефіцієнту С

Назва мішалки	С
Турбінна	0,117

визначається за формулами:

Знайдене за формулою значення діаметра вала округляється до більшого стандартного.

Значення d_v прийmemo зі стандартного ряду:

$$d_v = 0,065_m.$$

Потужність, що витрачається на тертя в торцьовому ущільненні визначається за формулами:

$$N_{уш} = 6020 d_v^{1,3} = 6020 \cdot 0,065^{1,3} = 172,339 ;$$

Потужність привода мішалки розраховуємо за формулою:

$$N_{вл} = (K_n \cdot K_h \cdot \sum K_i \cdot N + N_{уш}) / \eta = (1,25 \cdot 0,93 \cdot 1,09 \cdot 569 + 172,339) / 0,9 = 993 \text{ Вт} = 0,993 \text{ кВт}.$$

Знайдене значення $N_{вл}$ округлюємо до найближчого стандартного:

$$N_{вл} = 1,5 \text{ кВт}.$$

Згідно даних розрахунків візьмемо з каталогу електродвигунів стандартний двигун та ротор: привід вертикальний з кінцевою опорою вала МН-5857-66 потужністю 1,5 кВт та швидкістю обертання валу 200 об/хв або $3,33 \text{ с}^{-1}$.

5.2.5. Тепловий розрахунок

Вихідні дані для розрахунку:

Температура живильного середовища: $t_p = t_{пс} = t_{пм} = 28^\circ\text{C};$

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

Температура повітря:

$$t_{\text{пов}} = 70^{\circ}\text{C};$$

Тривалість культивування:

$$\tau = 72 \text{ год.}$$

Інтенсивність аерації

$$V_{\Gamma} = 227 \text{ м}^3 / \text{год};$$

Теплоємність повітря :

$$C_{\text{пов}} = 1000 \text{ Дж} \div (\text{К} \cdot \text{кг});$$

Теплоємність води :

$$C_{\text{Т}} = 4200 \text{ Дж} \div (\text{К} \cdot \text{кг}).$$

Густина газу :

$$\rho_{\Gamma} = 1,29 \cdot \frac{273}{t_{\text{р}} + 273} = 1,29 \cdot \frac{273}{28 + 273} = 1,17 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

Теплоємність живильного середовища:

$$\begin{aligned} c_{\text{р}} = c_{\text{пс}} = c_{\text{пм}} &= 1,214 + 0,0046 + 4,186 \cdot \frac{100 - x}{x} + 0,0075 = \\ &= 1,214 + 0,0046 + 4,186 \cdot \frac{100 - 79}{79} + 0,0075 = 2,34 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}. \end{aligned}$$

Густина живильного середовища:

$$\rho_{\text{р}} = \rho_{\text{пм}} = 1003 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}.$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості живильного середовища:

$$\begin{aligned} \mu_{\text{р}} &= (2,7 + 0,192 \cdot x) \cdot t_{\text{ср1}}^{-0,426} = (2,7 + 0,192 \cdot 79) \cdot 28^{-0,426} \\ &= 4,41 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}. \end{aligned}$$

Коефіцієнт теплопровідності живильного середовища:

$$\begin{aligned} \lambda_{\text{пс}} = \lambda_{\text{пм}} &= 0,512 + 0,00095 \cdot |t_{\text{ср1}} - 40| = 0,512 + 0,00095 \cdot |28 - 40| \\ &= 0,523 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}} \end{aligned}$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості живильного середовища:

$$v_{\text{пс}} = v_{\text{пм}} = \frac{\mu_{\text{р}}}{\rho_{\text{р}}} = \frac{4,41 \cdot 10^{-3}}{1003} = 4,4 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}.$$

Маса повітря :

$$M_{\text{пов}} = \rho_{\Gamma} \cdot V_{\Gamma} = 1,17 \cdot 227 \cdot 72 = 19123,2 \text{ кг.}$$

Маса рідини:

$$M_{\text{р}} = \rho_{\text{р}} \cdot V_{\text{р}} = 1003 \cdot 1,8 = 1805,4 \text{ кг.}$$

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

Маса посівного матеріалу:

$$M_{\text{пм}} = 0,05 \cdot M_p = 0,05 \cdot 1805,4 = 90,27 \text{ кг.}$$

Маса поживного середовища:

$$M_{\text{пс}} = M_p - M_{\text{пм}} = 1805,4 - 90,27 = 1715,13 \text{ кг.}$$

Метою теплового розрахунку є визначення необхідної площі теплообміну та перевірка, чи забезпечить стандартна площа теплообміну сорочки ту кількість теплоти, яка необхідна для нагрівання, речовини.

Складемо тепловий баланс ферментера:

$$Q_T = Q_c + Q_n + Q_{\text{дис}} + Q_{\text{втр}},$$

Розрахуємо потрібну кількість теплоти для нагрівання розчину:

$$Q_c = C_p \cdot m \cdot \Delta t = 2340 \cdot 1805,4 \cdot 8 = 33797088 \text{ Дж,}$$

де Δt - різниця температур розчину, що нагрівається у ферментері:

$$\Delta t = t_{pe} - t_n = 28 - 20 = 8 \text{ } ^\circ\text{C},$$

де t_n – температура навколишнього середовища.

Теплота, що витрачається на нагрівання реактора:

$$Q_a = m_a \cdot C_a (t_{aK1} - t_{aH1}) = 8042 \cdot 470 \cdot (28-20) = 30237920 \text{ Дж} = 30 \text{ МДж}$$

де m_a – маса реактора, кг;

C_a – питома теплоємність матеріалу, з якого виготовлений реактор, $\frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{K}}$.

t_{aH1}, t_{aK1} – початкова та кінцева температури реактора при нагріванні, $^\circ\text{C}$.

Теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв, Дж:

$$Q_{\text{дис}} = N \cdot \tau_{\text{пер}} = 569 \cdot 72 \cdot 3600 = 147484800 \text{ Дж} = 147 \text{ МДж,}$$

де N – потужність, що витрачається на перемішування, Вт;

$\tau_{\text{пер}}$ – час перемішування, с.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

Розрахуємо втрати теплової енергії, які надходять в оточуюче середовище та візьмемо втрати:

$$Q_{\text{втр}} = Q_c \cdot 0,2 = 33797088 \cdot 0,2 = 6759417,6 \text{ Дж.}$$

Загальний баланс становить:

$$Q_T = Q_c + Q_a + Q_p + Q_{\text{duc}} + Q_{\text{втр}} = 33797088 + 30237920 + 147484800 + 6759417,6 = 218279225,6 \text{ Дж.}$$

$$\Delta t_{pe} = |t - t_1| = |28 - 45| = 17^\circ\text{C},$$

$$\Delta t_m = |t_{pe} - t_2| = |28 - 41| = 13^\circ\text{C}$$

$$A = \frac{\Delta t_{\delta}}{\Delta t} = \frac{17}{13} = 1,3 < 2,$$

де t_1 - температура теплоносія на вході в сорочку та t_2 – відповідно на виході, t_{pe} - температура речовини у ферментері.

Знаходимо середню різницю температур теплоносія:

$$\Delta t = \frac{\Delta t + \Delta t}{2} = \frac{17 + 13}{2} = 15^\circ\text{C}$$

Для апаратів з рубашкою при перемішуванні мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від рідини, яка перемішується, до стінки визначається з виразу:

$$N_u = \frac{\alpha \cdot D}{\lambda} - ,$$

$$\frac{\alpha_1 D_{\text{вн}}}{\lambda} = 0,36 \left(\frac{\rho n d_{\text{м}}^2}{\mu_{\text{реч}}} \right)^{0,67} \left(\frac{c_p \mu_{\text{реч}}}{\lambda} \right)^{0,33} \left(\frac{\mu_{\text{реч}}}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}.$$

де

Звідси коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що перемішується, до стінки [45]:

$$Nu = 0,36 \cdot \left(\frac{1003 \cdot 3,3 \cdot 0,4^2}{4,41 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,67} \cdot \left(\frac{2340 \cdot 4,41 \cdot 10^{-3}}{0,523} \right)^{0,33} \cdot \left(\frac{4,41 \cdot 10^{-3}}{4,41 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14} = 2438.$$

$$\alpha_1 = \frac{Nu \cdot \lambda}{D_{\text{вн}}} = \frac{2438 \cdot 0,523}{1,6} = 797 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

де $\lambda = 0,523 \text{ Вт}/(\text{м} \cdot \text{К})$ – коефіцієнт теплопровідності речовини при $t = 28^\circ \text{C}$; $\mu_{\text{ст}}$ і $\mu_{\text{реч}}$ – в'язкість речовини при температурі стінки і при середній температурі рідини; так як різниця між ними незначна приймаємо, що їх відношення дорівнює одиниці.

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від води до стінки апарата.

Знайдемо середню температуру стінки апарата [45]:

$$t_{\text{ст}} = \frac{t_{\text{реч}} + \Delta t_{\text{сер}}}{2} = 28 + \frac{15}{2} = 35,5^\circ \text{C},$$

Тоді різниця температур [45]:

$$\Delta t_2 = t_{\text{ст}} - \Delta t_{\text{сер}} = 35,5 - 15 = 20,5^\circ \text{C},$$

де $\Delta t_{\text{сер}}$ – середня різниця температур теплоносія.

$$Gr \cdot Pr = H_p^3 \cdot \Delta t_2 \cdot B = 1,06^3 \cdot 20,5 \cdot 60 \cdot 10^9 = 1,465 \cdot 10^{12},$$

де B – коефіцієнт, який відповідає значенню середньої температури води.

$$Nu_u = C(G_r \cdot P_r)^n = 0,15 \cdot (1,465 \cdot 10^{12})^{0,33} = 1548,6$$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарата до води:

$$\alpha_2 = (Nu_2 \cdot \lambda_6) \div H_{\text{руб}} = (1548,6 \cdot 0,6) \div 1,5 = 607,44 \text{ Вт}/(\text{м} \cdot \text{К}).$$

Розрахуємо термічний опір стінки апарата:

$$\delta \div \lambda_{\text{ст}} = 0,01 \div 17,5 = 0,00057 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Коефіцієнт теплопередачі від охолоджуючої рідини до охолоджувальної води:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda_{cm}} + \frac{1}{\alpha_2}}$$

$$K = 288,18 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К}).$$

Розрахуємо необхідну поверхню теплообміну ферментера:

$$F = Q_T / (K \tau \Delta t_{сер}) = 218279225,6 / (288,18 \cdot 72 \cdot 3600 \cdot 15) = 0,195 \text{ м}^2.$$

Розрахована площа теплообміну 0,195 м² є меншою ніж стандартна (12 м²), тобто забезпечує необхідну температуру у ферментері протягом його роботи без додаткових теплообмінників.

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Загальнозаводське обладнання, має задовольняти вимоги, які б виключали можливість контамінації на стадіях виробничого процесу (підготовка поживного середовища, виробниче культивування, тощо) та забезпечували асептичність виробництва.

Насос з маркуванням КМП 40-25-160. призначений для подачі виробничо-технічних рідин і прісної води. Він забезпечує функціонування циркуляційних, водопостачальних, опалювальних систем. Технічні характеристики: потужність 2,2 КВт, подача 6,3 м³ /год або 1,75 м³ /с), напором 32 м. Маса насосу —46 кг. Для проведення точного завантаження обладнання обраний об'ємнаговий дозатор ДОП-60, що дозволяє з високою точністю проводити завантаження сировини в автоматичному режимі.

Електричний привід використовується для приведення в дію оборотного валу, на якому встановлено перемішуючий пристрій. MR102-90L - модель співвісного циліндричного мотор-редуктора промислового призначення для одержування обертів на виході 100 - 300 об/хв. Мотор-

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

редуктор виготовляється в виконанні на лапах, фланцевому і комбінованому виконанні. Потужність такого електричного приводу складає 1,5 КВт.

Гойдалка для колб РОТАБІТ SELECTA виконує круговий і зворотнопоступальний рух за вибором. Регулювання швидкості від 20 до 230 коливань в хвилину, амплітуда коливань 15 або 20 мм. Гойдалка має цифровий дисплей, на якому відображається кількість обертів і температура навколишнього середовища.

Для контролю параметрів процесу виробничого процесу нарощування біомаси необхідне встановлення всередині інокулятора: температурного пірометра, тахометру для виміру кутової швидкості мішалки, манометру для виміру надлишкового тиску (електроконтактний ЕКМ-10. Діапазон вимірювання тиску: від 25 до 75 % діапазону показань. Діапазон показань: 0-2,5 МПа) та датчику рН(з платиновим ТСП термоперетворювачем опору, вих. сигнал: 4 – 20мА, діапазон вимірювання рН 0-14).

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежобезпеки та екологічної безпеки. Постійний контроль і суворе дотримання технологічної дисципліни, технологічного регламенту, дотримання при цьому правил і норм правил техніки безпеки і виробничої санітарії – одна з гарантованих умов безпеки. Основними складовими безпеки праці на виробництві є:

- безпечне виробниче обладнання;
- безпечні технологічні процеси;
- організація безпечного виконання робіт

Вимоги безпеки до виробничого обладнання конкретних груп, видів, моделей розробляються відповідно до вимог ГОСТ 12.2.003-91 з урахуванням призначення, виконання та умов його експлуатації. Безпека виробничого обладнання забезпечується:

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

- вибором принципів дії, джерел енергії, параметрів робочих процесів;
- мінімізацією енергії, що споживається чи накопичується;
- застосуванням вмонтованих в конструкцію засобів захисту та інформації про можливі небезпечні ситуації;
- застосуванням засобів автоматизації, дистанційного керування та контролю;
- обмеженням фізичних і нервовопсихологічних навантажень працівників.

Конструкція апарата повинна бути надійною, забезпечувати безпеку при експлуатації та передбачувати можливість огляду, чищення, промивки, продувки та ремонту апарата. Внутрішні пристрої в апараті повинні бути як правило зйомними. Конструкція апарата, який зігрівається гарячим паром чи газом, повинна забезпечувати надійне охолодження стінок, які знаходяться під тиском, до розрахункової температури.

Зварні шви повинні розташовуватись поза опор апарата. У випадках, коли ця вимога не може бути виконана необхідно передбачити контроль підпорних швів.

Обслуговуючий персонал повинен неухильно виконувати інструкції по режиму роботи та безпечному обслуговуванню апарата і своєчасно перевіряти справність арматури, вимірювальних приладів, передаточних пристроїв.

Апарат повинен бути зупинено при:

- а) підвищенні тиску вище допустимого;
- б) несправності запобіжних клапанів;
- г) виникненні пожеж, які загрожують апарату під тиском;
- д) несправності манометра;
- е) несправності або нестачі засобів кріплення;
- з) несправності запобіжних блокувальних пристроїв;

і) несправності (відсутності) передбачених проектом контрольно-вимірювальних приладів та засобів автоматики.

Згідно до ДСТУ 2293-99, виробнича санітарія – це система організаційних, гігієнічних і санітарно-технічних заходів та засобів запобігання впливу на працівників шкідливих виробничих факторів. Сфера дії виробничої санітарії – запобігання професійної небезпеки, яка може призвести до професійних або професійно-обумовлених захворювань у тому числі і смертельних при дії в процесі роботи таких факторів як випромінювання електромагнітних полів, іонізуючого випромінювання, шумів, вібрацій, хімічних речовин, тощо.

Створення оптимальних параметрів досягається шляхом автоматизації процесу кондиціювання та вентиляції всіх відділень приміщення. Апарати, що випромінюють тепло мають бути накритими відповідними теплоізоляційними матеріалами. Якщо не вдається виключити всі дестабілізуючі фактори роботи працюючих, необхідно застосовувати підсолену газовану воду, для підтримання працездатності працюючих.

Працювати мають право лише ті працівники, які пройшли інструктаж із техніки безпеки та мають досвід роботи з обладнанням. Робота має проводитися лише на справному обладнанні, за наявності кожуха на вузлах, що обертаються та при заземленні обладнання. Згідно з робочим регламентом періодично проводиться перевірка відповідності реальних показників встановленим нормам. Безпечність умов праці сильно залежить від строків проведення планово-технічних ремонтів, зовнішнього та внутрішнього огляду приміщення, огляд обладнання в час планових та капітальних ремонтів. Перенесення строків планово-технічних ремонтів є неприпустимим. Подібна халатність часто призводить до страшних аварій, які легше попередити ніж ліквідувати.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва препарату для захисту рослин від фітопатогенів Стрептофунгін обрано продуцент *Streptomyces albus* UN 44.
2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів та запропоновано схему отримання продуценту шляхом двоступінчастої послідовної обробки мутагенами у встановлених дозах: нітратною кислотою і ультрафіолетовим випромінюванням.
3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Streptomyces albus* UN 44 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі гідролізованого крохмалю та соєвого борошна, а також визначені раціональні параметри культивування: температура $28 \pm 1^\circ\text{C}$, тривалість 72 год, рН 7,8-78,2.
4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для його культивування обрана і розрахована конструкція ферментеру 3 м³ з механічним перемішуючим пристроєм - турбінною мішалкою та барботером.
5. Запропоновано використання сушарки розпилюючого типу для висушення біомаси продуценту.
6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва препарату для захисту рослин у поліетиленових пакетах по 0,5 кг.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розробив		Тараман Ю.В.					
Консульт.							
Керівник		Тодосієчук Т.С.					
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	74	80
					НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» ФБТ		

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Л.О. Білявська, Т.О. Галаган, Г.О. Іутинська. Антинематодна активність метаболітів, що продукуються ґрунтовими стрептоміцетами : монографія. Київ : ІМБ НАН України, 2016, 47 с.
2. Biliavska L.A., Kozyritska V.E., Kolomiets Y.V., Babich A.G., Iutynska G.O. Phytoprotective and growth-regulatory properties of bioformulations on the base of soil streptomycetes metabolites. *Dopovidi NANU*. 2015; 1: 131–37.
3. Biliavska L.O., Kozyritska V.E., Valagurova O.V., Iutynska G.O. Biologically active substances of new microbial preparation Avercom. *Microbiologichny zhurnal*. 2012; 74 (3): 10–15.
4. Tretyakov A.P., Kruchina S.N., Stirmanova N.I., Sodomov V.E. The use of microbiological preparations against root-knot nematodes in greenhouses. *Agrokimiya*. 1997; 6: 67–70.
5. Пат. 109568 Україна. Штам *Streptomyces albus* – продуцент комплексу антибіотичних речовин і комплекс антибіотичних речовин, що має протигрибкову дію / Т.С. Тодосійчук, С.М. Яремчук, О.В. Покас; власник Т.С. Тодосійчук. – № 201311432; Заявл. 27.09.2013; Опубл. 10.04.2015. – 7–5 с.
6. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты: Учебное пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 81 с.
7. Bergey's manual of systematic bacteriology / Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig, William B. – New York.: Whitman Springer, 2012 – 357 с.
8. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ./ Под ред. Дж.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Тараман Ю.В.			СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		
Консульт.							
Керівник		Тодосійчук Т.С.					
Затвер.							
						Стадія	Аркуш
						Д	75
						Аркушів	
						80	
						НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського»	
						ФБТ	

- Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейла, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с.
9. Красильников Н.А. Биология отдельных групп актиномицетов. – М.: Наука, 1965. – 380 с.
 10. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia* / Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская, М.А. Свешникова и др. – М.: Наука, 1983. – 248 с.
 11. Егоров И.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.
 12. Громико О. Антагоністичні властивості актиноміцетів, виділених із ризосфери чистотілу великого *Chelidonium Majus L.* : монографія. Львів: ЛНУ ім. І.Франка, 2014, 286 с.
 13. Пат. 109568 Україна. Штам *Streptomyces albus* – продуцент комплексу антибіотичних речовин і комплекс антибіотичних речовин, що має протигрибкову дію / Т.С. Тодосійчук, С.М. Яремчук, О.В. Покас; власник Т.С. Тодосійчук. – № 201311432; Заявл. 27.09.2013; Опубл. 10.04.2015. – 7–5 с.
 14. Studies in the biochemistry of micro-organisms. Cyclopolic and cyclopaldic acids, metabolic products of *Penicillium cyclopium* Westling [Електронний ресурс] / J.Birkinshaw, H. Raistrick, D. Ross, C. Stickings // *Biochem J.* – 1952. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1197719/?page=1>.
 15. Тодосійчук Т.С. Поліваріантна біотехнологія препаратів-антисептиків на основі мікробних бактеріолізинів : Дис. докт. техн. наук :– 2016. – 370 с.
 16. Antibiotics: origin, nature and properties / T. Korzybski, Z. Kowszyk, W. Kurylowicz . – Warszawa: Polish scientific publisher, 1967. – 1359 p.
 17. Егоров И.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.

18. Головей О.П. Технологія антибіотиків та лікарських препаратів: Конспект лекцій. - Кам'янське, 2017. – 121
19. Chubachi K., Furukawa M., Fukuda S., Matsumura S., Yanagisawa T., Itagawa H., Nakagawa A. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol science*. 2002; **7**: 25–29.
20. Biliavska L.O., Pidlypska V.A., Kozyritska V.Y., Iutynska G.A. Biosynthetic activity of soil streptomycetes – antagonists of plan-parasitic nematodes and phytopathogens. *Proceedings of the 4th European Conference on Biology and Medical Sciences*. «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. Austria, Vienna. 2015: 10–17.
21. Hussey R.S., Janssen G.J.W. Root-knot nematodes *Meloidogyne* species. In: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Eds.: J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge. United Kingdom: CAB International, 2002: 43–70.
22. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; **71** (3): 495–548.
23. Pandey A., Ali I., Butola K.S., Chatterji T., Singh V. Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2011; **2** (4): 384–392.
24. Тодосійчук Т., Іздебська Т, Громико О., Федоренко В. Сучасний стан і перспективи біотехнологічного виробництва антибіотиків // *Біологічні Студії*. – 2011. – С. 159–172.
25. Пат. 120622 Україна. Спосіб підвищення продукції полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074 / О.Т.Кошля, Б.О.Остап. – Опубл. 10.11.17, Бюл. №21.- 7с.

26. Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome [Електронний ресурс] // Biomed Central. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3937824/>.
27. Li H. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives / H. Li, C. Krueger // Pharm. Ther. — 1991. — 51. — P. 239–255.
28. Ylihonko K. A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway / K. Ylihonko, J. Tuikkanen, S. Jussila et al. // Mol. Gen. Genet. — 1996. — 251. — P. 113–120.
29. Bibb. M. J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* // Microbiology. — 2005. — 8. — P. 208–215.
30. Klymyshin D. Role of the snorA gene in the nogalamycin biosynthesis by *Streptomyces nogalater* Lv65 / D. Klymyshin, T. Gren, V. Fedorenko // Microbiology. — 2011. — 80. № 4. — P. 496–501.
31. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Кн 2. / Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова, В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высш. шк., 1988. – 208 с.
32. Кротова Л.А., Чибис С.П. Эколого-генетическое влияние химических соединений на адаптацию растений // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6.
33. Пат. 109568 Україна. Штам *Streptomyces albus* – продуцент комплексу антибіотичних речовин і комплекс антибіотичних речовин, що має протигрибкову дію / Т.С. Тодосійчук, С.М. Яремчук, О.В. Покас; власник Т.С. Тодосійчук. – № 201311432; Заявл. 27.09.2013; Опубл. 10.04.2015. – 7–5 с.
34. Todosiichuk T., Zelena L., Klochko V. Multistage selection of soil actinomycete *Streptomyces albus* as a producer of antimicrobial substances // Food Agric. – 2015. - №27. – С. 250–257.
35. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навч. посіб. Київ, 2009. 177с.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

36. Пат. 109568 Україна. Штам *Streptomyces albus* – продуцент комплексу антибіотичних речовин і комплекс антибіотичних речовин, що має протигрибкову дію / Т.С. Тодосійчук, С.М. Яремчук, О.В. Покас; власник Т.С. Тодосійчук. – № 201311432; Заявл. 27.09.2013; Опубл. 10.04.2015. – 7–5 с.
37. ГОСТ 12302-2013 Пакеты из полимерных пленок и комбинированных материалов. Общие технические условия.
38. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2015 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика».
39. Оборудование микробиологических производств / К.А.Калунянц, Л.И. Голгер, В.Е. Балашов. – М.: Агропромиздат, 1987.-398 с.
40. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. – М.: Химия, 1973. – 750 с.
41. Тимонин А.С. Основы конструирования и расчета химико технологического и природоохранного оборудования. Изд. 2-е. Том 2. – Калуга: Издательство Н. Бочкаревой, 2002. – 560 с.
42. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. II. – СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2007. – 1142 с.
43. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник / Л.І. Ружинська, І.А. Буртна, В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибєцький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 – 130 с.
44. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология»/ А.Н. Аркадьев, А.М. Безборода, И.Н. Блохин и др.; Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 498 с.
45. ГОСТ 20680 – 75. Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные.
46. ГОСТ 6533-78. Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов. Основные размеры.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

47. Аппаратура микробиологической промышленности / В.Н. Соколов, М. А. Яблокова. – Л.: Машиностроение. Ленингр. Отд-ние, 1988. –278 с.
48. Машины и аппараты химических производств. Под общ. ред. В.Н. Соколова - Л., 1982.
49. Аппаратура микробиологической промышленности / В.Н. Соколов, М. А. Яблокова. – Л.: Машиностроение. Ленингр. Отд-ние, 1988. – 278 с.

					ДП 6214. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80